

HISTOCHEMISCHE UND IMMUNFLUORESCENZTECHNISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK DER ENTZÜNDUNGSREAKTION
IN DER FRÜHPHASE EINER KONTAKTDERMATITIS
AM MEERSCHWEINCHEN

BIE - SWAN TAN - NATTERMANN

1985

*Des
München*

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. O. Braun-Falco

HISTOCHEMISCHE UND IMMUNFLUORESCENZTECHNISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR KINETIK DER ENTZÜNDUNGSREAKTION IN DER FRÜHPHASE EINER
KONTAKTDERMATITIS AM MEERSCHWEINCHEN

Inaugural Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Bie-Swan TAN-NATTERMANN

aus München

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Ring

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. O. Braun-
Falco

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 9.7.1985

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
A. Einleitung	4
B. Material und Methodik	6
1.1. Versuchstiere	6
1.2. Reagenzien	6
2.1. Sensibilisierung, Auslösung und Vorbe- handlung	11
2.2. Gewinnung der Gewebsproben	11
3.1. Verarbeitung der Gewebsproben	12
3.2. Direkte Immunfluoreszenz	12
3.3. Enzymzytochemische Nachweismethoden	13
a) Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase	
b) saure Phosphatase	
4. Auswertung der Präparate	16
C. Ergebnisse	17
1.1. Direkte Immunfluoreszenz an sensibili- sierten Meerschweinchen	17
1.2. Direkte Immunfluoreszenz nach Auslösung einer Kontaktdermatitis durch DNCB (2%, 1%, 0,5%) und gleichzeitiger intraderma- ler Applikation von Pharmaka und Serum- lösungen	17
1.2.1. Direkte Immunfluoreszenz nach Auslösung durch DNCB (2%)	18

1.2.2.	Direkte Immunfluoreszenz nach Auslösung durch DNCB (1%)	19
1.2.3.	Direkte Immunfluoreszenz nach Auslösung durch DNCB (0,5%)	20
2.	Untersuchung der zellulären Infiltration mit enzymzytochemischen Methoden	21
2.1.	Ausgangswerte an sensibilisierten Meerschweinchen	21
2.2.	Zellkinetik der Makrophagen und Mastzellen nach dem Auslösen einer Kontaktdermatitis durch DNCB-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen	22
2.2.1.	Auslösung der Dermatitis durch DNCB (2%)	22
2.2.2.	Auslösung der Dermatitis durch DNCB (1%)	23
2.2.3.	Auslösung der Dermatitis durch DNCB (0,5%)	24
2.3.	Einfluß von Antihistaminika auf die Zellkinetik von Makrophagen und Mastzellen bei einer Kontaktdermatitis	26
2.3.1.	nach Auslösung durch DNCB (2%)	26
2.3.2.	nach Auslösung durch DNCB (1%)	28
2.3.3.	nach Auslösung durch DNCB (0,5%)	30
2.4.	Einfluß von Antilymphozytenglobulin und Antilymphokinserum sowie entsprechende Kontrollserumlösungen auf die Zellkinetik von Makrophagen und Mastzellen bei der DNCB (2%, 1%, 0,5%)-induzierten Kontaktdermatitis	33
2.4.1.	Anwendung von Humanalbumin und humanem Immunglobulin G und Auslösung durch DNCB (2%)	33
2.4.2.	Anwendung von Antilymphozytenglobulin und Auslösung durch DNCB (2%)	36
2.4.3.	Anwendung von Antilymphozytenglobulin und Auslösung durch DNCB (1%)	39
2.4.4.	Anwendung von Antilymphozytenglobulin und Auslösung durch DNCB (0,5%)	41

- 2.4.5. Anwendung von Antilymphokinserum und Auslösung durch DNCB (1%)
- 2.4.6. Anwendung von Antilymphokinserum und Auslösung durch DNCB (1%, 0,5%)

D. Diskussion

- 1. Diskussion der Methodik
- 2. Pathomechanismus der allergischen Kontaktdermatitis
- 3. Verhalten der Makrophagen und Mastzellen in der Frühphase der allergischen und toxischen Kontaktdermatitis
- 4. Die Rolle des Komplementsystems bei der allergischen und toxischen Kontaktdermatitis
- 5. Die Rolle der Lymphokine bei der allergischen Kontaktdermatitis
- 6. Die Wirkung von Antilymphozytenglobulin auf die allergische und toxische Kontaktdermatitis
- 7. Der Einfluß von Histamin (H_1 - und H_2 -) Antagonisten auf die allergische Kontaktdermatitis

E. Zusammenfassung

F. Literaturverzeichnis

G. Anhang

- 1. Danksagung
- 2. Lebenslauf

A. EINLEITUNG

Der Begriff Allergie wurde zum ersten Mal von PIRQUET (68) im Jahre 1906 geprägt. Darunter verstand er eine veränderte Reaktionslage des Organismus. Heute meint man mit Allergie eine immunologisch bedingte, krankmachende Überempfindlichkeitsreaktion (80).

Nach COOMBS und GELL (24) unterscheidet man vier Arten der allergischen Reaktion, die sich sowohl in ihrem zeitlichen Ablauf als auch in der klinischen Erscheinungsform unterscheiden:

1. die anaphylaktische Reaktion (Typ I)
2. die zytotoxische Reaktion (Typ II)
3. die Immunkomplex-Reaktion (Typ III)
4. die Spättypreaktion (Typ IV)

Die ersten drei Reaktionen werden humorale Allergie genannt. Sie laufen relativ rasch ab. Beim sensibilisierten Organismus kann es nach Zufuhr des Allergens bei einer Typ I-Allergie (Sofortreaktion) innerhalb von Sekunden bis etwa 20 Minuten (58) zur Reaktion kommen. Die Antikörper bei Typ I-Allergie sind IgE, die Mediatorsubstanzen sind u.a. Histamin, Serotonin, Leukotriene, lysosomale Enzyme, Prostaglandine sowie Plättchen-aktivierender Faktor (82).

Die Spättypreaktion ist eine zelluläre Allergie, hier ist die spezifische Sensibilisierung an T-Lymphozyten gebunden. Auf Antigenreiz erfolgt die spezifische Reaktion in zwei bis drei Tagen.

Die Spättypreaktion setzt sich zusammen aus:

1. der Induktionsphase (Primärantwort=Sensibilisierung)
2. der Auslösephase (Sekundärantwort=Challenge)

In der Induktionsphase bindet sich das auf die Haut aufgetragene Agens als "Hapten" an körpereigene Proteine. Nur als Hapten-Proteinkomplex ist es in der Lage eine allergische Reaktion hervorzurufen (30, 48, 71). Als Mediatoren der zellulären Reaktion fungieren sogenannte Zytokine oder Lymphokine (5, 8, 37, 41, 53, 77, 78, 88).

Der Begriff Lymphokine wurde von DUMONDE et al. (25) gebildet und beinhaltet alle biologisch aktiven Mediatoren, die keine Antikörper sind, und die nach Lymphozytenaktivierung entstehen. Es ist heute bekannt, daß Lymphokine nicht nur von Lymphozyten, sondern auch durch andere Zellarten gebildet werden können (48).

Als Mediatoren der zellulär vermittelten Immunreaktion sind sie in der Lage, Entzündungsreaktionen auszulösen und zu unterhalten (13, 105, 108, 109). Es ist heute möglich, Antikörper gegen einige Lymphokine zu entwickeln (33, 34, 40, 111). Nach neueren Untersuchungen wird angenommen, daß basophile Granulozyten möglicherweise eine Rolle in der Entstehung des allergischen Kontaktekzems spielen (2, 45, 73, 74, 90). Im sensibilisierten Organismus kommt es nach erneutem Antigenkontakt zu einer Sekundärantwort (79), die sich je nach Lokalisation der Reaktion als allergische Kontaktdermatitis (intraepidermal) oder als allergische Reaktion vom Tuberkulintyp (subepidermal) zeigt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zellulären Veränderungen in der Frühphase der Kontaktdermatitis. Sie konzentriert sich auf die Rolle der Mastzellen und Makrophagen. Zur bekannten Rolle der Lymphozyten sei auf die Literatur verwiesen (1, 30, 48, 55, 73, 74). Bei diesen Untersuchungen wurden auch die Unterschiede zwischen einer allergischen und einer toxischen Kontaktdermatitis verglichen, da oft die Abgrenzung der morphologischen Kriterien schwierig ist. Daneben wurde der Einfluß verschiedener Pharmaka auf die Zellkinetik der Mastzellen und Makrophagen untersucht. Da es bisher kaum Erkenntnisse über humorale Phänomene bei der Kontaktdermatitis gibt, wurde im Rahmen der Untersuchungen mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik auch nach Antikörper-vermittelten Reaktionen gesucht.

B MATERIAL UND METHODIK

1.1. Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an 25 Albino-Meerschweinchen (Stamm Perbright white) von etwa 600 g Gewicht durchgeführt. Die Tiere wurden mit Altromin M Pellets und Wasser ad libitum ernährt.

1.2. Reagenzien

1.2.1. 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (DNCB)

Als Kontaktallergens für die Sensibilisierung (6, 42, 76) wurde 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (Fa. Merck, Darmstadt) verwendet (siehe Abb. 1)

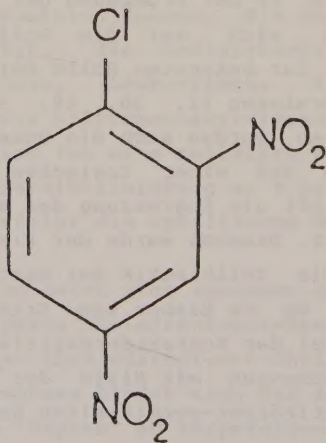


Abb. 1: Chemische Struktur von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol ($C_5H_3ClN_2O_4$)

In unseren Versuchen applizierten wir das Allergen in Salbenform. Dazu wurde DNCB in Eucerin anhydricum appliziert (21). Die Rezepturen lauten:

1-Chlor-2,4-dinitrobenzol	2
Eucerin anhydricum	ad 100,0
M. f. ung.	
S.: 2%ige DNCB-Salbe	

1-Chlor-2,4-dinitrobenzol	1
Eucerin anhydricum	ad 100,0
M. f. ung.	
S.: 1%ige DNCB-Salbe	

1-Chlor-2,4-dinitrobenzol	0,5
Eucerin anhydricum	ad 100,0
M. F. ung.	
S.: 0,5%ige DNCB-Salbe	

1.2.2. FITC (Fluorescein isothiocyanat konjugiertes) Anti-Meerschweinchen-C3

Das FITC markierte Anti-Meerschweinchen-C3 (Fa. Dynatec, Tilburg, Bestellcode: GAGp/C3c (BlA) wird gefriergetrocknet geliefert und bei 4° bis 6°C gelagert. Das Präparat wird vor Gebrauch in 1 ml isotoner Kochsalzlösung aufgelöst und kann 15 Minuten nach der Aufbereitung verwendet werden.

Das Präparat wird aus dem Vollblut von Ziegen gewonnen, die mit gereinigtem C3 von Meerschweinchen immunisiert sind. Das so gewonnene Serum wird chromatographisch gereinigt, bis man die gewünschte Anti-C3 Komponente erhält und mit Fluorescein isothiocyanat konjugiert.

1.2.3. Humanalbumin

100 ml des Präparates Humanalbumin 20% (Behringwerke AG, Marburg) enthalten steriles Humanalbumin 20 g (Salzgehalt 34 - 42 mmol/l, Elektrolytgehalt Na^+ 130 mmol, Cl^- 40 mmol/l, Caprylat 16 mmol/l, N-Acetyl-DL-tryptophanat 16 mmol/l).

1.2.4. Humanes Immunglobulin G

Verwendet wurde Intraglobin® (Fa. Biotest, Serum Institut, Frankfurt). Eine Flasche enthält 500 mg lyophilisierte menschliche Immunglobulin G, 18 mg Na, 27 mg Cl und 0,25 g Glucose. Das Pulver wird in 10 ml aqua ad injectabilia aufgelöst, 0,1 ml der Lösung enthält 5 mg Immunglobulin G.

1.2.5. Antilymphozytenglobulin (ALG)

In unseren Untersuchungen wurde Pferde-Anti-Human-Lymphozytenglobulin (Behringwerke AG, Marburg) verwendet. 1 ml der Lösung enthält 50 mg Pferdeimmunglobulin. Das ALG wurde aus dem Blut von Pferden gewonnen, die mit menschlichen Lymphozyten sensibilisiert wurden. Nach Angaben der Firma enthält ALG keine Gewebsproteine oder antierythrozytäre Antikörper. Bei in vitro Testungen kommt es zur Lyse der Lymphozyten, wahrscheinlich durch direkte Zytotoxizität (17,50,91). Die von uns verwendete Charge besaß einen lymphozytotoxischen Titer von 1:512.

Das in unseren Versuchen verwendete ALG ist zwar gegen menschliche Lymphozyten gerichtet, es bestehen jedoch Kreuzreaktionen mit den Lymphozyten anderer Spezies, u.a. auch Meerschweinchenlymphozyten (75).

1.2.6. Normal-Ziegen-Serum (NZS)

Das Serum wird durch das Zentrifugieren von Ziegenblut gewonnen und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

Das NZS diente in unseren Versuchen als Kontrolle zu dem im nächsten Abschnitt beschriebenen Antilymphokinserum (ALK), das ebenfalls von der Ziege stammt, um die durch das ALK hervorgerufenen Reaktionen unterscheiden zu können.

1.2.7. Antilymphokinserum (ALK)

Das von Prof. de Weck (Bern) hergestellte und uns freundlicherweise überlassene ALK stammt von der Ziege und enthält Antikörper gegen MIF (Macrophage inhibitory factor), gegen SRF (Skin reactive factor) und gegen MF (Mitogenic factor) (33).

Die Antikörperlösung war bis zur Verwendung ein halbes Jahr lang bei -70°C gelagert.

1.2.8. Clemastin (H_1 -Rezeptorenblocker)

Als H_1 -Antagonist wurde Clemastin (Tavegil®) verwendet (s. Abb. 2)

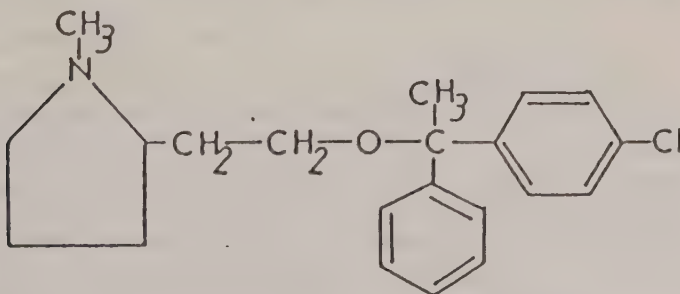


Abb. 2: Chemische Struktur von Clemastin 2 (2-(p-Chlor- α -methyl-benzyl-oxy)-aethyl)-1-methyl-pyrrolidin

1 Ampulle Tavegil® (Fa. Sandoz AG, Nürnberg) enthält 2,68 mg Clemastinhydrogenfumarat (entsprechend 2,0 mg der Base) in 5 ml. 0,1 ml der Ampullenlösung (=0,04 mg Clemastin) wurden intrakutan injiziert.

1.2.9. Cimetidin (H₂-Rezeptorenblocker)

Als H₂-Antagonist wurde Cimetidin (Tagamet®) verwendet (s. Abb. 3)

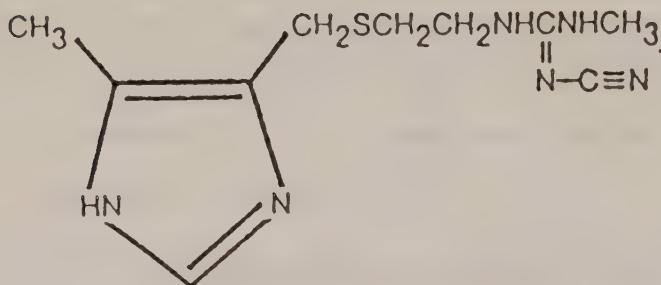


Abb. 3: Chemische Struktur von Cimetidin (N''-Cyan-N-Methyl-N'-(2((5-Methyl-1H-Imidazol-4-yl)methyl)Thio)-Ethyl)Guanidin

1 Ampulle Tagamet® (Fa. Smith-Kline-Danelsberg, Göttingen) enthält 229 mg Cimetidinhydrochlorid (= 200 mg Cimetidin) in 2 ml.

Cimetidin ist ein kompetitiver Hemmer der Histaminaktivität am H₂-Rezeptor.

1.3.1. Kombination von Clemastin und Cimetidin

In der Testreihe wurde eine Mischung aus beiden

Antihistaminika hergestellt. 0,1 ml der Lösung enthalten 0,02 mg Clemastin und 5 mg Cimetidin.

Durch die Vermischung sind keine Wechselwirkungen durch biochemischen Umbau oder chemische Bindung zu erwarten.

Es soll durch die Kombinationsbehandlung untersucht werden, welche Auswirkungen eine H_1 - und H_2 -Rezeptorenblockade auf den Reaktionsablauf haben.

2.1. Sensibilisierung, Auslösung und Vorbehandlung

Die Sensibilisierung der Tiere erfolgte am Nacken durch das tägliche Einreiben eines 4 cm^2 großen Hautareals mit 2%iger DNCB-Salbe (19,21,29,32,57,61,72,93). Die vorgesehene Fläche wurde mit einem elektrischen Haarschneider vorsichtig rasiert, um Verletzungen der Hautoberfläche zu vermeiden. Es folgte eine Latenzzeit von 14 Tagen, bevor die Auslösung erfolgte.

Der Meerschweinchenrücken wurde als Ort der Testreaktion gewählt, und ca. 2 cm^2 große Testfelder auf der rasierten Haut mit nicht wasserlöslichem Filzschreiber markiert und beschriftet. Mit Hilfe einer Tuberkulinspritze wurde jeweils 0,1 ml der Testsubstanzen intradermal injiziert. Es bildeten sich ca. 1 mm^2 große Quaddeln.

Im gleichen Arbeitsgang wurde DNCB-Salbe in verschiedenen Konzentrationen dünn aufgetragen, um die Entzündungsreaktion in Gang zu bringen.

2.2. Gewinnung der Gewebeproben

In einem Zeitraum von 2 - 24 Stunden (zur Erfassung der Kinetik) nach Auslösung der Kontaktdermatitis wurden die Tiere getötet und entblutet. Die Haut mit den markierten Feldern wurde, falls nötig, erneut mit dem elektrischen Haarschneider rasiert und dann sofort freipräpariert. Die entnommenen Gewebestücke wurden in Alufolie eingepackt,

beschriftet und tiefgefroren. Die Tierexperimente wurden gemeinsam mit H. Grimm durchgeführt, in dessen Dissertationsschrift andere Aspekte der allergischen Kontaktdermatitis am Meerschweinchen behandelt wurden (39).

3.1. Verarbeitung der Gewebeproben

Für die verschiedenen Untersuchungen wurden aus den tiefgefrorenen Gewebsstücken auf dem Krostaten (System IEC-Krostatt, Fa. Darmon, USA) 8 μ und 14 μ dicke Schnitte angefertigt. Für die direkte Immunfluoreszenztechnik wurden die 8 μ dicken Schnitte, für die enzymzytochemische Untersuchungsmethode die 14 μ dicken Schnitte benötigt.

Die Krostattschnitte wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

3.2. Direkte Immunfluoreszenz zum Nachweis von C3-Ablagerungen

Es wurde eine Methode verwendet, die auf der von ROSE und FRIEDMANN (87) beschriebenen aufbaut.

- Die 8 μ dicken Krostattschnitte werden für 3 mal 10 Min. in Puffer nach Nairn gewaschen.
- Verdünnung des Inkubationsserums (FITC-markiertes Anti-Meerschweinchen-C3) mit Pufferlösung in folgende Verdünnungsreihen:

1 : 3	1 : 4
1 : 6	1 : 8
1 : 12	1 : 16
1 : 24	1 : 32
1 : 48	1 : 62
- Inkubation der Krostattschnitte mit dem verdünnten Serum für 30 Min. in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

- 3 mal 10 Min. in Puffer waschen
- Eindecken in Glyzeringelatine, die aus 9 Teilen Glyzerin und 1 Teil Puffer besteht.
- Auswertung unter einem Ortholux II Fluoreszenzmikroskop (Fa. Zeiss, Wetzlar).

Puffer nach Nairn (0,01 molares PO_4 mit einem pH von 7,1)

Herstellung: 8,5 g NaCl
 1,07 g Na_2HPO_4 (ohne H_2O)
 0,39 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
 ad 1000 ml aqua dest.

Sind Komplementablagerungen im Gewebe vorhanden, so leuchten diese im Fluoreszenzmikroskop auf.

3.3. Enzymzytochemische Nachweismethoden

Zur Untersuchung der Entzündungszellen werden folgende Enzyme histochemisch nachgewiesen:

NASDCAE Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase
 sPh saure Phosphatase

a) Nachweis von NASDCAE (Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase zur Identifizierung von Mastzellen)

Die Bestimmung von NASDCAE erfolgte nach der Methode von BURG (22).

1. Inkubationsmedium:

- a) 1 Tropfen 4% Pararosanilinlsg. in 2 n Hcl mit
 1 Tropfen 4% wässriger Natriumnitritlsg.
 mischen und nach 60 Sek. mit
 30 ml 0,1 M Michaelispuffer, pH 7,62
 verdünnen.

Den pH der Lösung mit 2 n HCl auf 6,3
titrieren

b) 10 mg Naphtol-AS-D-Chloracetat in
1 ml Dimethylformamid lösen

a) unter kräftigem Rühren zu b) geben und filtrieren

2. Die 14 μ dicken Kyrostatschnitte 30 Min. bei Raumtempera-
tur inkubieren

3. In Leitungswasser abspülen

4. 5 Min. in Hämalan eintauchen

5. Bläuen mit aqua dest

6. Eindecken der Präparate mit Eukitt

Herstellung des Michaelipuffers:

9,714 g Natriumacetat	a
14,714 g Barbital-Natrium	
ad 500 ml H ₂ O	

0,1 n HCl = b

200 ml von Lösung a	ad 1000 ml aqua dest
160 ml von Lösung b	

Der pH-Wert des Michaelipuffers beträgt 7,62

Fermentaktivität erzeugt einen äußerst fein dispersen
leuchtend roten Farbstoff.

b) Nachweis von saurer Phosphatase (sPh) zur Identifizierung von Makrophagen

Die Bestimmung von sPh erfolgte nach LEDER (54).

1. Reaktionslösung:

a) 6 Tropfen Pararosanilinlsg. in 2 n HCl mit
6 Tropfen wässriger Natriumnitritlsg. mischen
und nach 60 Sek. mit
30 ml 0,1 M Michaelispuffer, pH 7,62 verdünnen.
Diese Lösung wird mit 2 n HCl auf einen pH von 5,0
titriert.

b) 10 mg Naphtol-AS-Bi-Phosphat in
1 ml Dimethylformamid lösen

a und b werden vermischt und filtriert

2. Die 14 μ dicken Kyrostatschnitte werden 2 Std. bei
Raumtemperatur mit der Lösung inkubiert

3. Mit Leitungswasser abspülen

4. Gegenfärbung mit Hämalaun für 5 Min. bei Raumtemperatur

5. Bläuen mit aqua dest

6. Eindecken mit Eukitt

Enzymaktivität stellt sich durch einen leuchtend roten
homogenen Farbstoff dar.

4. Auswertung der Präparate

Bei der direkten Immunfluoreszenztechnik werden die Präparate unter einem Ortholux II Fluoreszenzmikroskop (Fa. Zeiss, Wetzlar) auf Komplementablagerungen untersucht. Sind Ablagerungen vorhanden, so leuchten diese im Fluoreszenzmikroskop auf.

Bei dem enzymzytochemischen Verfahren werden die Präparate unter einem Mikroskop (Fa. Zeiss, Wetzlar) bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Die Zellen mit Enzymaktivität wurden pro Gesichtsfeld gezählt. Bei einem Gesichtsfeldradius von 0,235 mm ergab die Fläche pro Blickfeld $0,17 \text{ mm}^2$ ($F=r^2$). Dabei bemühten wir uns, daß nicht mehr als zwei größere Gefäße erfaßt wurden, da mit der Anzahl der Gefäße auch die Anzahl der Mastzellen ansteigt. Von drei willkürlich ausgesuchten Gesichtsfeldern wurde der Durchschnittswert der Zellzahl ermittelt.

C. ERGEBNISSE

1.1. Direkte Immunfluoreszenz an sensibilisierten Meerschweinchen

Bei drei sensibilisierten Meerschweinchen wurden von verschiedenen Körperarealen Hautproben auf Komplementablagerungen untersucht.

Tier	Rücken	Bauch	Pfote
1	Ø	Ø	Ø
2	Ø	Ø	Ø
3	Ø	Ø	Ø

Tab. 1: Direkte Immunfluoreszenz nach Sensibilisierung mit 2%iger DNCB-Salbe

Aus Tab. 1 wird ersichtlich, daß bei keinem der untersuchten Tieren Komplementablagerungen im Gewebe vorhanden waren.

1.2. Direkte Immunfluoreszenz nach Auslösung einer Kontaktdermatitis durch DNCB (2%, 1%, 0,5%) und gleichzeitiger intradermalen Applikation von Pharmaka und Serumlösungen

Getestet wurden in unseren Versuchsreihen die Antihistaminika Clemastin (Cl) 0,04 mg, Cimetidin (Ci) 5 mg und ein Lösungsgemisch aus 0,02 mg Clemastin und 5 mg Cimetidin (Cl/Ci). An Seren kamen zur Verwendung 0,2 g Humanalbumin (HA), 5 mg humanes Immunglobulin G (HIG), 5 mg Antilymphozytenglobulin (ALG), Antilymphokinserum (ALK) und Antilympho-

kinserum in einer 1:10-Verdünnung (ALK 1:10).

1.2.1. Direkte Immunfluoreszenz nach Auslösung durch DNCB (2%)

Den Tieren wurden jeweils 0,1 ml NaCl 0,9%, Humanalbumin (HA), humanes Immunglobulin G (HIG), Antilymphozytenglobulin (ALG) und Clemastin (Cl) intradermal injiziert.

Die Untersuchungen im Immunfluoreszenzmikroskop waren bei allen Tieren negativ (siehe Tab. 2).

Tier	Zeitpunkt nach Injektion in Std.	NaCl	HA	HIG	ALG	Cl
4	2 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
5	4 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
6	6 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
7	10 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
8	24 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Tab. 2: Ergebnisse der direkten Immunfluoreszenz bei einer Kontaktdermatitis, ausgelöst durch 2%ige DNCB-Salbe und gleichzeitiger intradermaler Applikation von NaCl, Humanalbumin (HA), humanem Immunglobulin G (HIG), Antilymphozytenglobulin (ALG) und Clemastin (Cl). Die Auswertung erfolgte 2, 4, 6, 10 und 24 Stunden nach Injektion.

1.2.2. Direkte Immunfluoreszenz nach Auslösung durch DNCB (1%)

Verglichen wurden NaCl 0,9%, Normal-Ziegen-Serum (NZS), Antilymphozytenglobulin (ALG), Antilymphokinserum (ALK), ALK 1:10, Cimetidin (Ci) und die Kombination Clemastin/Cimetidin (Cl/Ci). Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der direkten Immunfluoreszenstechnik nach Inkubation mit FITC-markierten Anti-Meerschweinchen-C₃.

Zeitpunkt								
Tier	nach Injektion	NaCl	NZS	ALG	ALK	ALK1:10	Ci	Cl/Ci
in Std.								
9	2 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
10.	2 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
11	4 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
12	4 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
13	6 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
14	10 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
15	24 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
16	24 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Tab. 3: Direkte Immunfluoreszenz bei einer Kontaktdermatitis nach Auslösung durch DNCB (1%) und Quaddelung durch NaCl, Normal-Ziegen-Serum (NZS), Antilymphozytenglobulin (ALG), Antilymphokinserum (ALK), Antilymphokinserum 1:10 (ALK1:10), Cimetidin (Ci) und Lösungsgemisch aus Clemastin und Cimetidin (Cl/Ci). Die Gewebsentnahme erfolgte 2, 4, 6, 10 und 24 Stunden (h) nach Injektion.

1.2.3. Direkte Immunfluoreszenz nach Auslösung durch 0,5%ige DNCB-Salbe

Die Tiere wurden sofort nach Auslösung der Reaktion mit jeweils 0,1 ml NaCl 0,9%, Antilymphozytenglobulin (ALG), Antilymphokinserum (ALK), ALK1:10 verdünnt und Cimetidin (Ci) behandelt.

Bei den mit FITC-markierten Anti-Meerschweinchen C3 inkubierten Gewebestücken konnten keine C3-Ablagerungen nachgewiesen werden (siehe Tab. 4).

Zeitpunkt		NaCl	ALG	ALK	ALK1:10	Ci
Tier	nach Injektion in Std.					
17	2 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
18	4 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
19	8 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
20	24 h	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Tab. 4: Ergebnisse der direkten Immunfluoreszenz nach Auslösung durch 0,5%ige DNCB-Salbe und Injektion von NaCl, Antilymphozytenglobulin (ALG), Antilymphokinserum (ALK), Antilymphokinserum 1:10 (ALK1:10) und Cimetidin (Ci). 2, 4, 8 und 24 Stunden (h) nach Injektion wurden die Tiere getötet.

2. Untersuchung der zellulären Infiltration mit enzymcyto-chemischen Methoden

2.1. Ausgangswerte am sensibilisierten Tier

Es wurden jeweils Haut vom Rücken, Bauch und von der Pfote dreier Meerschweinchen entnommen.

Die Gewebeproben enthielten im Durchschnitt 4,9 Mastzellen/0,17 mm² und 15,4 Makrophagen/0,17 mm² (siehe Tab. 5).

Tier	Rücken	Bauch	Pfote	
1	5	4	6	Mastzellen/0,17 mm ²
	15	16	16	Makrophagen/0,17 mm ²
2	5	5	4	Mastzellen/0,17 mm ²
	16	15	15	Makrophagen/0,17 mm ²
3	4	6	5	Mastzellen/0,17 mm ²
	15	14	16	Makrophagen/0,17 mm ²

Tab. 5: Anzahl der Mastzellen und Makrophagen pro Gesichtsfeld (0,17 mm²) in Meerschweinchenhaut beim sensibilisierten Tier vor der Auslösung einer Entzündungsreaktion.

2.2. Zellkinetik der Makrophagen und Mastzellen nach dem Auslösen einer Kontaktdermatitis durch DNCB-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen

Um die Entzündungsreaktion in Gang zu bringen, wurden DNCB-Salben in drei verschiedenen Konzentrationen verwendet: 2%ige, 1%ige und 0,5%ige Lösungen.

2.2.1. Auslösung der Dermatitis durch DNCB (2%)

Die Mastzellendichte veränderte sich im Versuchszeitraum nur minimal. Vor Auslösung der Reaktion konnten 5 Zellen pro Gesichtsfeld (Z/GF), 24 Stunden nach DNCB-Applikation 12 Z/GF gezählt werden.

Gegenüber dem Ausgangswert von 15 Z/GF kam es zu einer deutlichen Zunahme der Makrophagen auf 30 Z/GF in 24 Stunden.

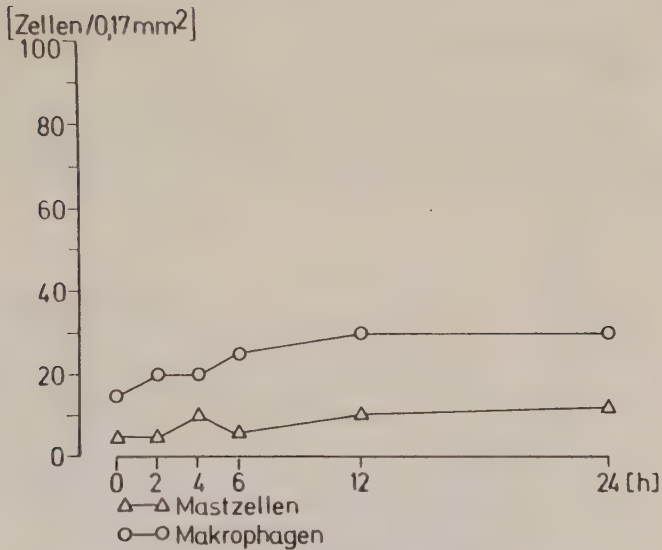


Abb. 1: Zellzahl (Z) pro $0,17 \text{ mm}^2$ (GF) in Abhängigkeit von der Zeit (h) nach dem Auftragen von 2%iger DNCB-Salbe. Die Zahl der Mastzellen und der Makrophagen zum Zeitpunkt 0 entspricht den Ausgangswerten am sensibilisierten Tier vor Auslösung der Reaktion (DNCB 2%).

2.2.2. Auslösung der Dermatitis durch DNCB (1%)

In 24 Stunden nahm die Anzahl der Mastzellen von 5 Zellen pro Gesichtsfeld auf 15 Z/GF zu. Der Gehalt an Makrophagen stieg von 15 Z/GF auf 40 Z/GF kontinuierlich an.

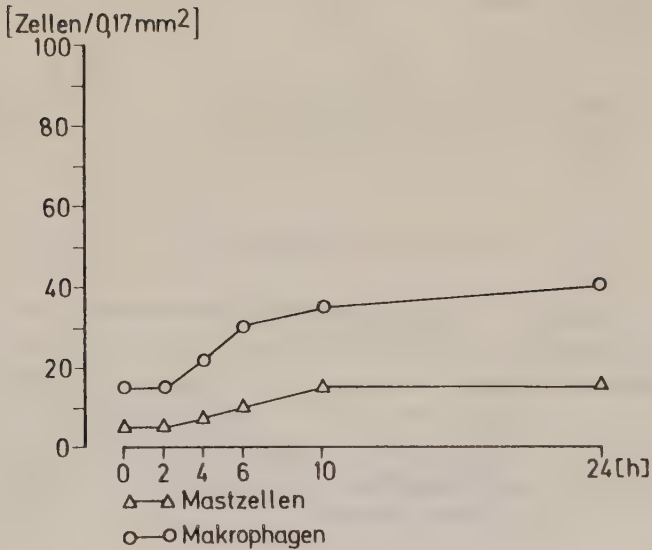


Abb. 2: Zunahme der Infiltratzellen (Z) pro $0,17 \text{ mm}^2$ (GF) im Verlauf einer Dermatitis (DNCB 1%) in Abhängigkeit von der Zeit (h).

Zum Zeitpunkt 0 entspricht die Zahl der Mastzellen und Makrophagen den Ausgangswerten vor Auslösung der Dermatitis (DNCB 1%).

2.2.3. Auslösung der Dermatitis durch DNCB (0,5%)

Die Mastzelleninfiltration veränderte sich bis zur achten Stunde nicht. Erst dann setzte ein starker Zustrom an Mastzellen ein. In der 24. Stunde erreichte die Zelldichte 38 Z/GF (Ausgangswert: 5 Z/GF)

Im Verlauf der Kinetik der Makrophagen fiel der steile Anstieg zwischen der zweiten (18 Z/GF) und der vierten (50 Z/GF) Stunde auf. Einer Stagnation zwischen der vierten und achten Stunde schloß sich eine weitere Zunahme der Makrophagen auf 75 Z/GF an.

Hier wurden im Vergleich zur Kontaktdermatitis, ausgelöst durch DNCB (2%) und DNCB (1%), die höchsten Werte sowohl bei den Makrophagen als auch bei den Mastzellen gefunden.

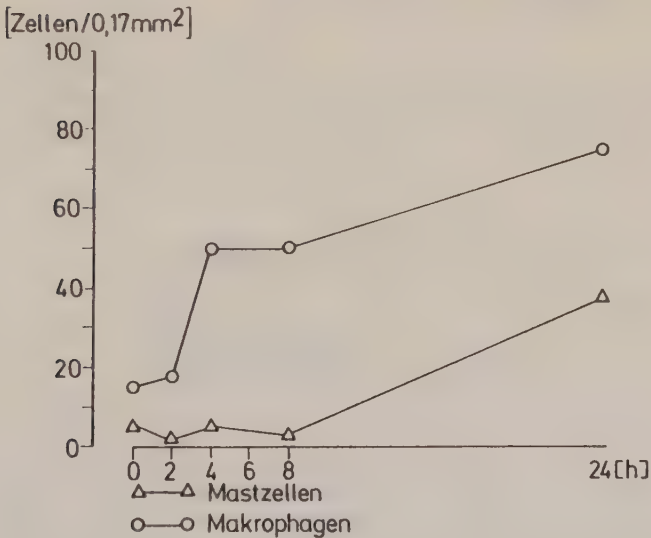


Abb. 3: Änderung der Zellzahl (Z) pro 0,17 mm² (GF) in Abhängigkeit von der Zeit (h) nach der Auslösung der Dermatitis mit 0,5%iger DNCB-Salbe.

Die Zahl der Makrophagen und Mastzellen zum Zeitpunkt 0 (h) entspricht den Ausgangswerten vor Auslösung der Dermatitis (DNCB 0,5%).

2.3. Einfluß von Antihistaminika auf die Zellkinetik von Mastzellen und Makrophagen bei einer Kontaktdermatitis

Untersucht wurden Clemastin (H_1 -Rezeptorenblocker), Cimetidin (H_2 -Rezeptorenblocker) und ein Lösungsgemisch aus beiden Substanzen bei Auslösung einer Kontaktdermatitis durch verschiedene DNCB-Konzentrationen.

2.3.1. Auslösung durch DNCB (2%)

Bei Verwendung von 0,04 mg Clemastin entsprach die Einwanderungskinetik der Mastzellen und Makrophagen der Zeleinwanderung der Kontrolltiere (siehe Abbildungen 4 und 5).

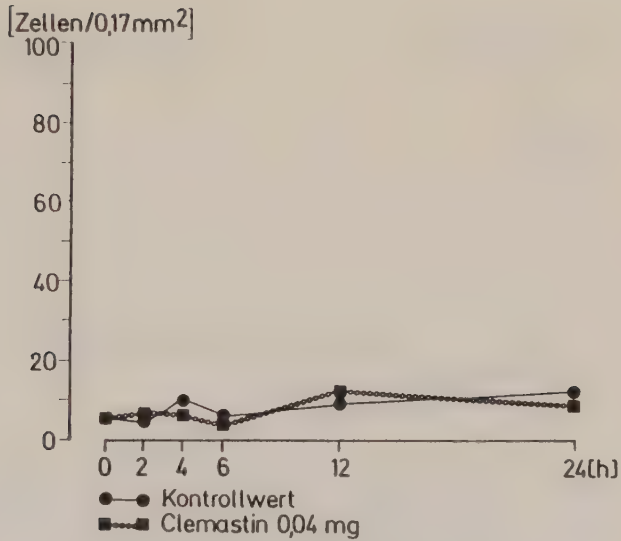


Abb. 4: Vergleich der Infiltrationsdichte der Mastzellen (Z) pro $0,17 \text{ mm}^2$ (GF) bei Verwendung von 0,04 mg Clemastin mit den Kontrollwerten im Verlauf einer Kontaktdermatitis (DNCB 2%). Zeit in h nach der Einleitung der Entzündungsreaktion.

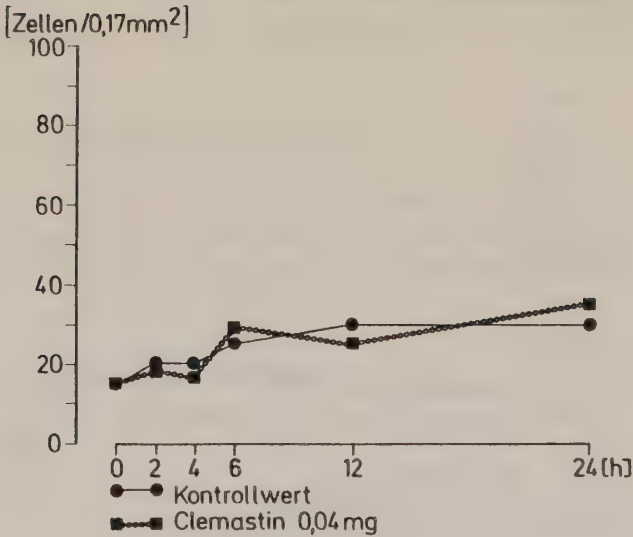


Abb. 5: Änderungen der Kinetik der Makrophagen im Verlauf einer DNCB (2%) induzierten Kontaktdermatitis unter dem Einfluß von Clemastin 0,04 mg, verglichen mit den unbehandelten Tieren. Aufgetragen wurden die Anzahl der Zellen (Z) pro 0,17 mm² (G/F) in Abhängigkeit von der Zeit (h).

2.3.2. Auslösung durch DNCB (1%)

In den ersten sechs Stunden unterschied sich die Kinetik der Mastzellen der mit Antihistaminika behandelten Tieren nur geringfügig von den Kontrolltieren. Nach zehn Stunden lag die Zelldichte unter Einfluß von Cimetidin (10 Z/GF) ein

wenig unter, und nach Gabe von Clemastin/Cimetidin (20 Z/GF) gering über dem Kontrollwert (15 Z/GF). Die Anzahl der Mastzellen war nach 24 Stunden bei Verwendung von Cimetidin mit 25 Z/GF und Clemastin/Cimetidin (20 Z/GF) höher als beim Kontrolltier (15 Z/GF).

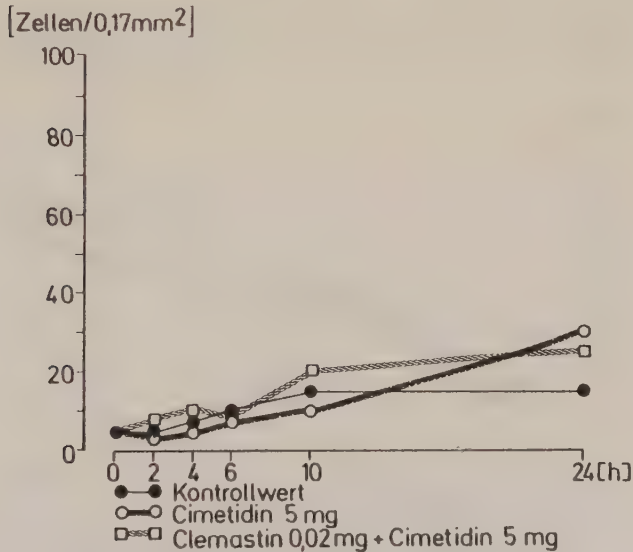


Abb. 6: Abhängigkeit der Mastzellendichte (Z/GF (0,17 mm²)) von der Zeit (h) nach der Einleitung der Dermatitis durch Aufbringen 1%iger DNCB-Salbe. Verglichen wurden Hautbezirke, die mit Cimetidin 5 mg und der Kombination von Clemastin 0,02 mg und Cimetidin 5 mg unterspritzt worden waren mit den unbehandelten Kontrollbereichen (=Kontrollwerte).

Nach zwei Stunden kam es zu keiner Einwanderung von Makrophagen bei den mit Antihistaminika behandelten und unbehandelten Tieren. Die Zellzunahme (Abb. 7) war nach 24 Stunden unter dem Lösungsgemisch Clemastin/Cimetidin am

größten (57 Z/GF), unter Einfluß von Cimetidin konnten 50 Z/GF gezählt werden (Kontrollwert 40 Z/GF).

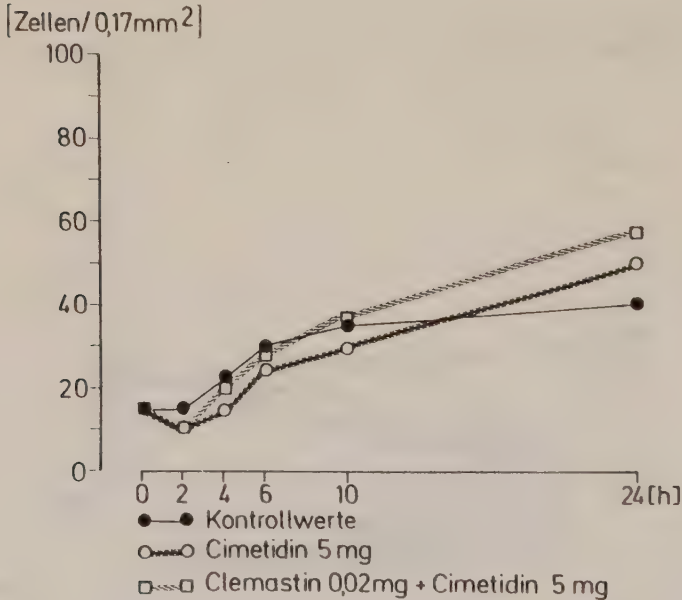


Abb. 7: Die Einwanderung von Makrophagen (Zellen/pro Gesichtsfeld ($0,17 \text{ mm}^2$) Z/GF) bei unbehandelten Tieren (=Kontrollwerte) verglichen mit Tieren, denen 5 mg Cimetidin und ein Gemisch aus 0,02 mg Clemastin intrakutan appliziert wurden. Zeit in Stunden (h) nach dem Aufbringen 1%iger DNCB-Salbe.

2.3.3. Mastzellen-Auslösung durch DNCB 0,5%

Während bei den Kontrolltieren eine Einwanderung der Mastzellen zwischen der achten (3 Z/GF) und der 24. Stunde (38 Z/GF) stattgefunden hatte, erfolgte nach Behandlung mit

Cimetidin der Mastzelleneinstrom bereits zwischen der vierten (7 Z/GF) und achten (20 Z/GF) Stunde. Der Anstieg der Mastzellen (Abb. 8) war unter dem Einfluß von Cimetidin nach 24 Stunden (25 Z/GF) nicht ganz so hoch wie beim Kontrolltier (38 Z/GF).

Die Einwanderungskinetik der Makrophagen nach Applikation von Cimetidin entsprach in großen Zügen der Zelleinwanderung bei den Kontrolltieren (Abb. 9).

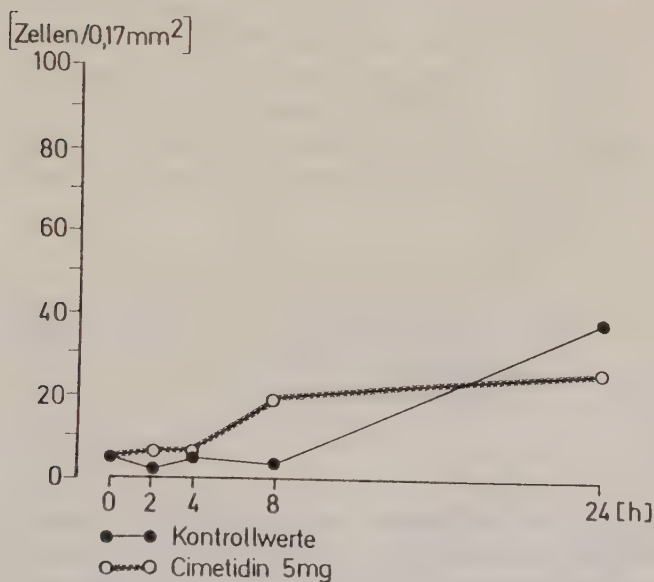


Abb. 8: Einfluß von 5 mg Cimetidin auf die Mastzellendichte (Z/GF (0,17 mm²)) während einer DNCB (0,5%)-induzierten Dermatitis. Zum Vergleich sind die Kontrollwerte (=unbehandelte Hautareale) eingezeichnet.

Zeit in Stunden (h) nach der Einleitung der Dermatitis.

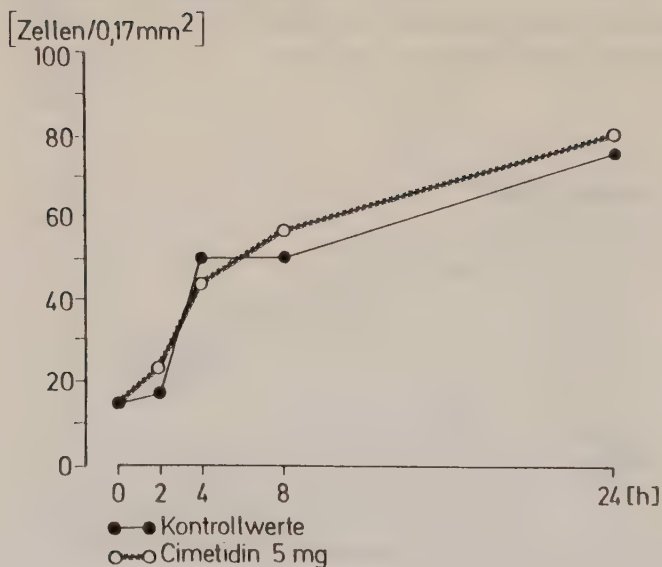


Abb. 9: Vergleich der Zellkinetik der Makrophagen (Zellen pro Gesichtsfeld ($0,17 \text{ mm}^2$) Z/GF) bei Verwendung von 5 mg Cimetidin mit den Kontrollwerten (=unbehandelte Hautareale) im Verlauf einer DNCB (0,5%)-induzierten Kontaktdermatitis. Zeit in Stunden (h) nach der Auslösung der Dermatitis.

2.4. Einfluß von Antilymphozytenglobulin (ALG) und Antilymphokinserum (ALK) sowie entsprechender Kontrollserumlösungen auf die Zellkinetik der Mastzellen und Makrophagen bei der DNCB (2%, 1%, 0,5%)-induzierten Kontaktdermatitis

2.4.1. Anwendung von Humanalbumin und humanem Immunglobulin G und Auslösung durch DNCB (2%)

Im Versuchszeitraum entsprach die Mastzellendichte unter Humanalbumin den Ausgangswerten (Tiere vor Auslösung der Reaktion). Es konnte keine Mastzelleneinwanderung beobachtet werden (Abb. 10). Nach Gabe von humanem Immunglobulin kam es zu einer minimalen Zunahme der Mastzellen mit einem Maximum von 15 Z/GF nach 12 Stunden (Kontrollwert 10 Z/GF). In der 24. Stunde waren die Werte des mit humanem Immunglobulin G behandelten Tieres mit dem Kontrolltier identisch (12 Z/GF).

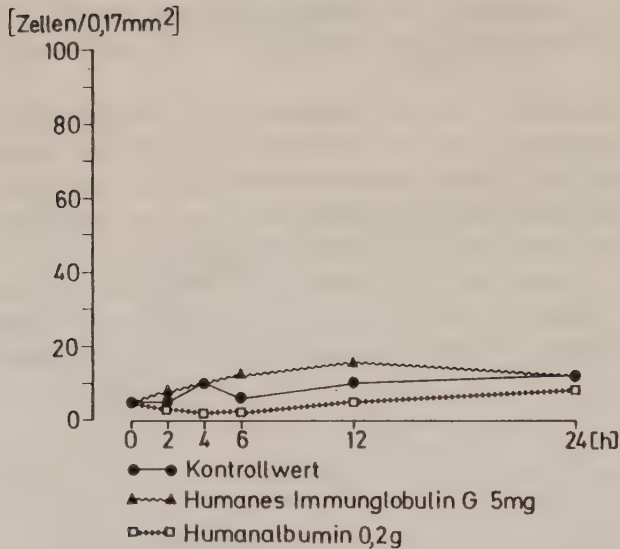


Abb. 10: Die Einwanderung von Mastzellen (Zellen/Gesichtsfeld ($0,17 \text{ mm}^2$) Z/GF) bei unbehandelten Kontrolltieren verglichen mit Tieren, denen $0,2 \text{ g}$ Humanalbumin und 5 mg humanes Immunglobulin in die untersuchten Hautbezirke appliziert worden sind. Zeit in Stunden (h) nach dem Aufbringen 2%iger DNCB-Salbe.

Bei Verwendung von Humanalbumin blieb die kontinuierliche Zunahme der Makrophagen unbeeinflusst; die Werte zu jedem Meßzeitpunkt lagen nur wenig über den Kontrollwerten (Abb. 11).

Unter dem Einfluß von humanem Immunglobulin war ein Anstieg

der Makrophagen nach der sechsten Stunde zu verzeichnen. Die Makrophageninfiltration nach 24 Stunden war mit 35 Z/GF etwas höher als beim Kontrollwert mit 30 Z/GF, und ein wenig niedriger als nach Applikation von Humanalbumin (40 Z/GF).

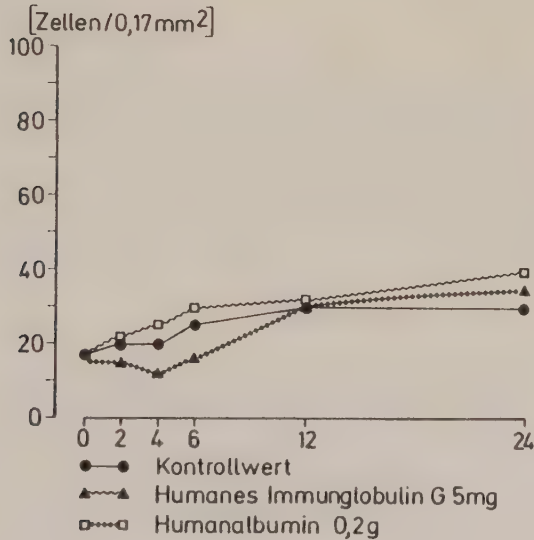


Abb. 11: Veränderung der Makrophagenzellendichte (Z/GF ($0,17 \text{ mm}^2$)) durch 0,2 g Humanalbumin und durch 5 mg humanem Immunglobulin bei DNCB (2%) - induzierter Kontaktdermatitis. Zum Vergleich sind die Kontrollwerte unbehandelter Hautbezirke eingezeichnet. Zeit in Stunden (h) nach Einleitung der Dermatitis.

2.4.2. Anwendung von Antilymphozytenglobulin und Auslösung durch DNCB (2*)

Bei Verwendung von Antilymphozytenglobulin veränderte sich im Versuchszeitraum die Mastzellendichte gegenüber der Mastzelleninfiltration vor Einleitung der Dermatitis nicht (siehe Abb. 12).

Wie aus Abb. 13 ersichtlich, bewirkte Antilymphozytenglobulin eine Zunahme der Makrophagen zur zwölften Stunde über die bei den Kontrolltieren beobachteten Werte. Unter Antilymphozytenglobulin war die Zelldichte nach 12 Stunden (40 Z/GF, Kontrollwert 30 Z/GF) und nach 24 Stunden (45 Z/GF, Kontrollwert 30 Z/GF) größer als bei den unbehandelten Tieren.

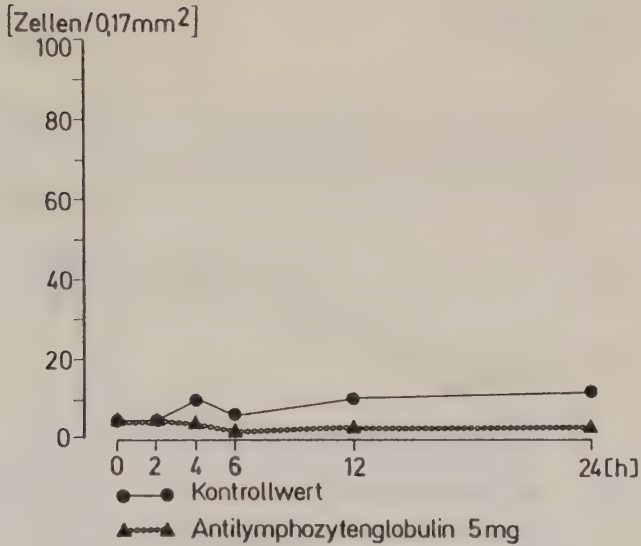


Abb. 12: Zellkinetik (Zellen/Gesichtsfeld ($0,17 \text{ mm}^2$) Z/GF) der Mastzellen bei intrakutaner Applikation von 5 mg Antilymphozytenglobulin im Verlauf einer DNCB (2%)-induzierten Dermatitis in Abhängigkeit von der Zeit (h) verglichen mit den Kontrollwerten (unbehandelte Hautproben).

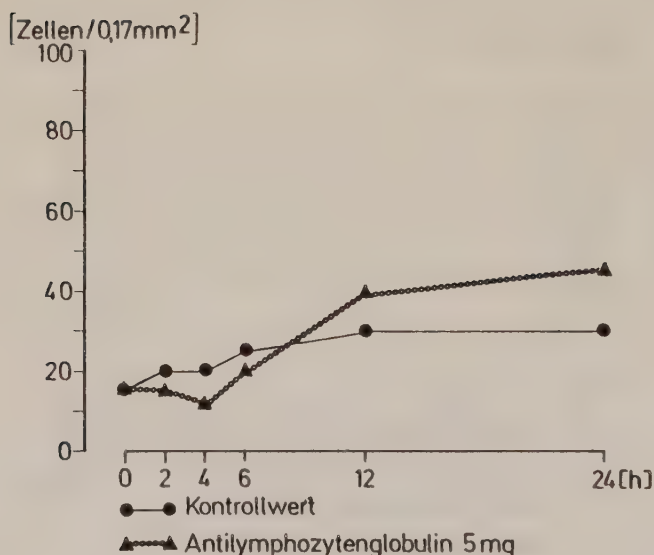


Abb. 13: Einfluß von 5 mg Antilymphozytenglobulin auf die Einwanderung von Makrophagen während einer DNCB (2%)-induzierten Dermatitis. Zum Vergleich sind die Kontrollwerte (unbehandelte Hautareale) eingezeichnet. Zeit in Stunden (h) nach der Einleitung der Dermatitis.

2.4.3. Anwendung von Antilymphozytenglobulin und Auslösung durch DNCB (1%)

Nach Applikation von 5 mg Antilymphozytenglobulin zeigte sich ein ähnliches Verhalten wie bei den unbehandelten Tieren. Die Anzahl der Mastzellen betrug nach 24 Stunden 22 Z/GF (Kontrollwert 15 Z/GF). Die Werte sind in Abb. 14 eingezeichnet.

Unter 5 mg Antilymphozytenglobulin setzte nach der vierten Stunde eine größere Einwanderung an Makrophagen ein als bei den Kontrolltieren. Gezählt wurden 55 Z/GF nach 24 Stunden, beim Kontrolltier dagegen 40 Z/GF (siehe Abb. 15).

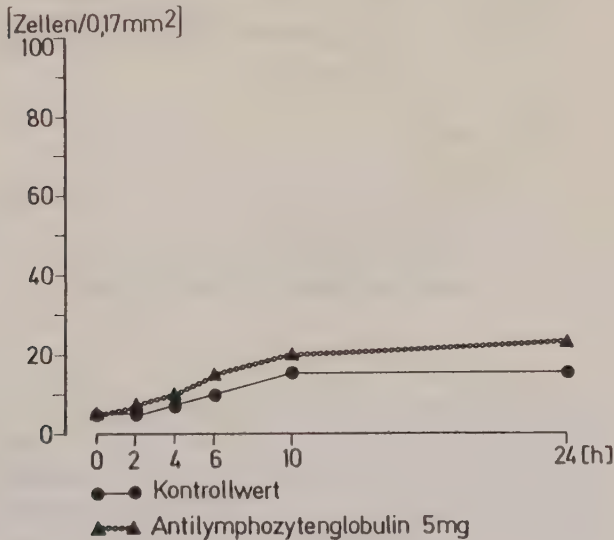


Abb. 14: Veränderung der Mastzellendichte (Z/GF (0,17 mm²)) durch 5 mg Antilymphozytenglobulin intraktuan bei einer Kontaktdermatitis (DNCB 1%), verglichen mit den Kontrollwerten (unbehandelte Hautbezirke). Die Zeit wird in Stunden (h) nach der Auslösung der Dermatitis angegeben.

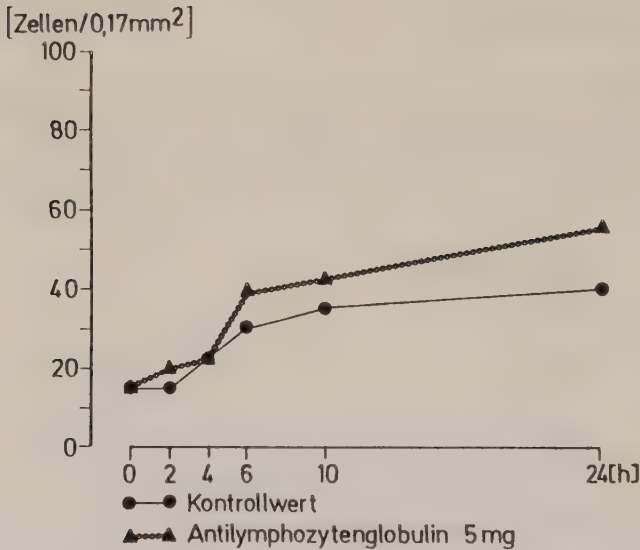


Abb. 15: Aufgetragen wurde die Makrophageneinwanderung (Zellen/Gesichtsfeld ($0,17 \text{ mm}^2$) Z/GF) bei DNCB (1%)-induzierter Kontaktdermatitis unter Behandlung mit 5 mg Antilymphozytenglobulin und die entsprechenden Kontrollwerte (unbehandelte Hautareale) in Abhängigkeit von der Zeit (h).

2.4.4. Anwendung von Antilymphozytenglobulin und Auslösung durch DNCB (0,5%)

Bei den mit Antilymphozytenglobulin behandelten Tieren setzte die Einwanderung der Mastzellen nach der vierten Stunde ein, bei den unbehandelten Tieren dagegen erst nach der achten Stunde. Nach 24 Stunden wurde unter Antilymphozytenglobulin (46 Z/GF) eine höhere Zelldichte als beim Kontrolltier (38 Z/GF) erreicht. Die Kinetik der Mastzellen ist in Abb. 16 dargestellt.

Unter Antilymphozytenglobulin konnte ein größerer Anstieg der Makrophagen beobachtet werden. Bei den unbehandelten Tieren konnte zu jedem Meßzeitpunkt eine höhere Zelldichte als bei den Kontrolltieren festgestellt werden (siehe Abb. 17).

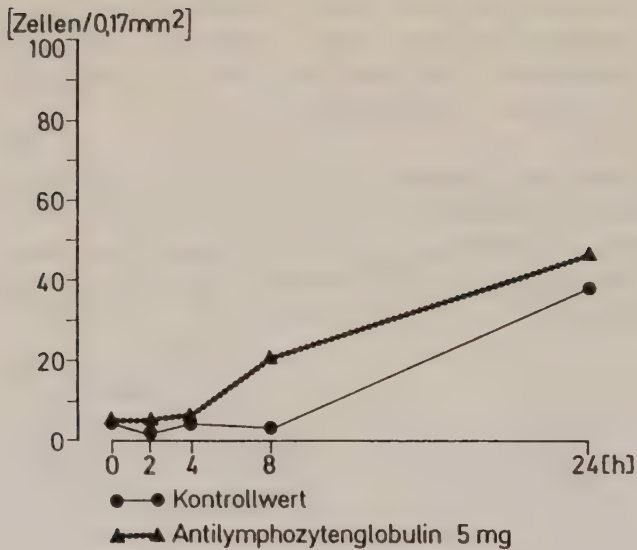


Abb. 16: Zellmigration der Mastzellen nach Gabe von 5 mg Antilymphozytenglobulin und dem Auftragen von 0,5%iger DNCB-Salbe, verglichen mit den Kontrollwerten (unbehandelte Hautproben). Zeit (h) nach Auslösung der Dermatitis.

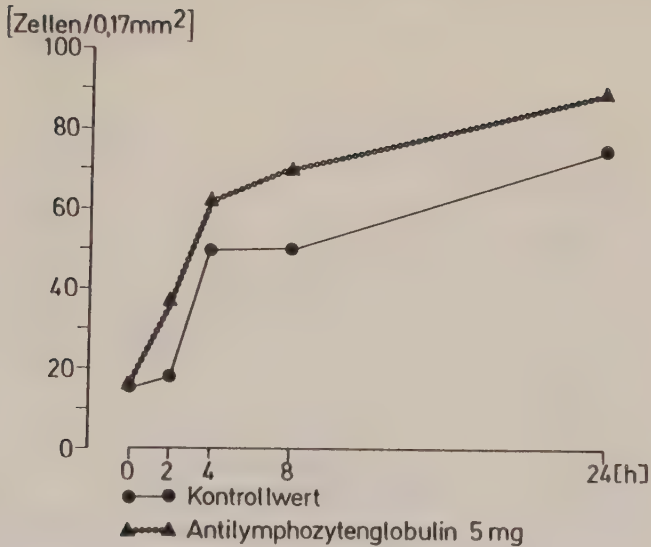


Abb. 17: Änderung der Anzahl der Makrophagen (Zellen/Gesichtsfeld (0,17 mm²) Z/GF) unter dem Einfluß von 5 mg Antilymphozytenglobulin nach Auslösung mit 0,5%iger DNCB-Lösung. Zum Vergleich sind die Kontrollwerte (unbehandelte Hautbezirke) eingezeichnet. Zeit in Stunden (h) nach Einleitung der Dermatitis.

2.4.5. Anwendung von Normal-Ziegen-Serum und Auslösung durch DNCB (1%)

Wie aus Abb. 18 und Abb. 19 ersichtlich, entspricht die Einwanderungskinetik der Mastzellen und Makrophagen bei Verwendung von Normal-Ziegen-Serum 0,1 ml den Kontrollwerten.

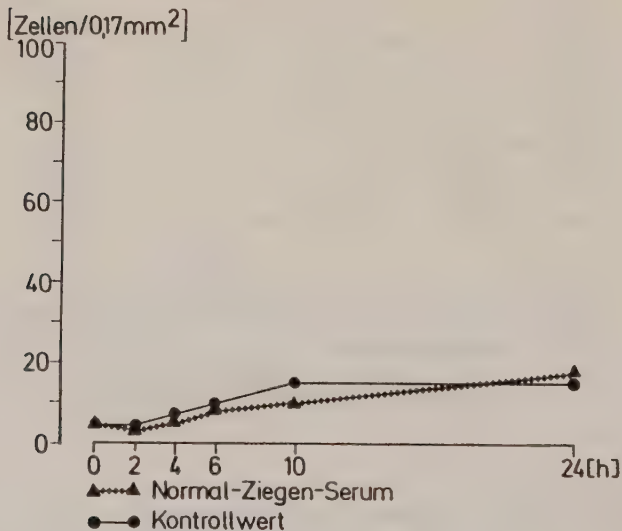


Abb. 18: Abhängigkeit der Zelldichte (Zellen/Gesichtsfeld (0,17 mm²) Z/GF) der Mastzellen nach Einleitung einer Kontaktdermatitis durch 1%iger DNCB-Salbe nach intrakutaner Applikation von 0,1 ml Normal-Goat-Serum. Zum Vergleich sind die Kontrollwerte (unbehandelte Hautareale) eingezeichnet. Zeit (h) nach Auslösung der Dermatitis.

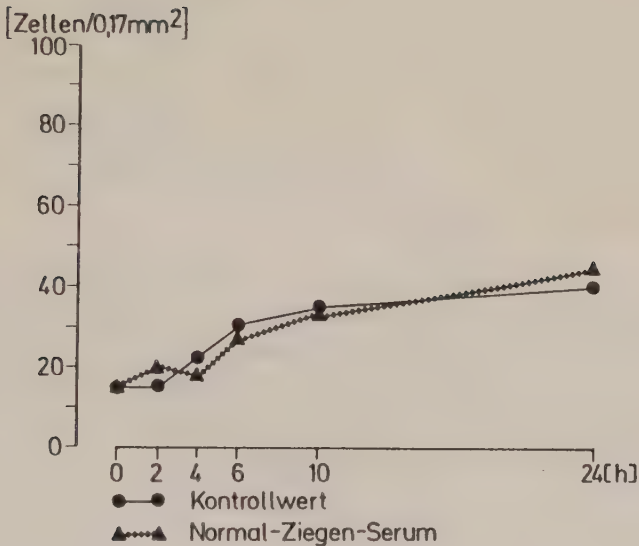


Abb. 19: Die Einwanderung von Makrophagen (Zellen/Gesichtsfeld ($0,17 \text{ mm}^2$) Z/GF) bei unbehandelten Kontrolltieren verglichen mit Tieren, denen $0,1 \text{ ml}$ Normal-Goat-Serum intrakutan injiziert wurden. Zeit in Stunden (h) nach dem Aufbringen 1%iger DNCB-Salbe.

2.4.6. Anwendung von Antilymphokinserum und Auslösung durch DNCB (1%, 0,5%)

Bei den Versuchen wurden jeweils $0,1 \text{ ml}$ der Stammlösung und eine 1:10-Verdünnung des Serums intrakutan appliziert nach Einleitung der Entzündungsreaktion mit 1%iger bzw. 0,5%iger DNCB-Salbe an den sensibilisierten Meerschweinchen.

Auslösung durch DNCB-Lösung (1%)

Bei der Auslösung durch 1%ige DNCB-Salbe konnte unter dem Einfluß von unverdünntem Antilymphokinserum im Versuchszeitraum eine geringgradig höhere Infiltrationsdichte der Mastzellen beobachtet werden. Nach Applikation von 1:10 verdünntem Antilymphokinserum gab es bis zur sechsten Stunde keinen Unterschied der Zellkinetik gegenüber den Kontrolltieren. Geringfügig höhere Werte konnten in der zehnten (20 Z/GF) und in der 24. (21 Z/GF) Stunde als bei den unbehandelten Tieren (15 Z/GF nach 10 und 24 Stunden) festgestellt werden (Abb. 20).

Unverdünntes Antilymphokinserum bewirkte eine etwas größere Zellinfiltration der Makrophagen. Zu jedem Meßzeitpunkt konnten mehr Zellen gezählt werden als bei den Kontrolltieren. Unter dem Einfluß von 1:10 verdünntem Antilymphokinserum entsprach die Kinetik der Makrophagen in großen Zügen den Kontrollwerten (siehe Abb. 21).

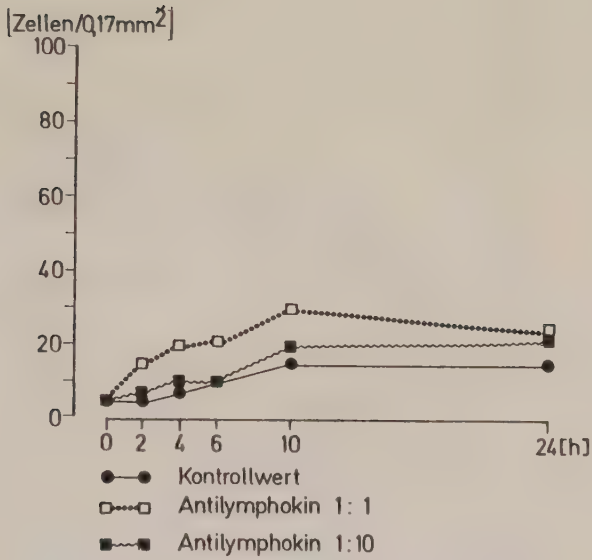


Abb. 20: Vergleich der Zellmigration (Zellen/Gesichtsfeld (0,17 mm²) Z/GF) der Mastzellen bei Verwendung von 0,1 ml Antilymphokinserum und von 0,1 ml 1:10 verdünntem Antilymphokinserum mit den Kontrollwerten (unbehandelte Hautproben) nach Auslösung einer Kontaktdermatitis mit 1%iger DNCB-Salbe in Abhängigkeit von der Zeit (h).

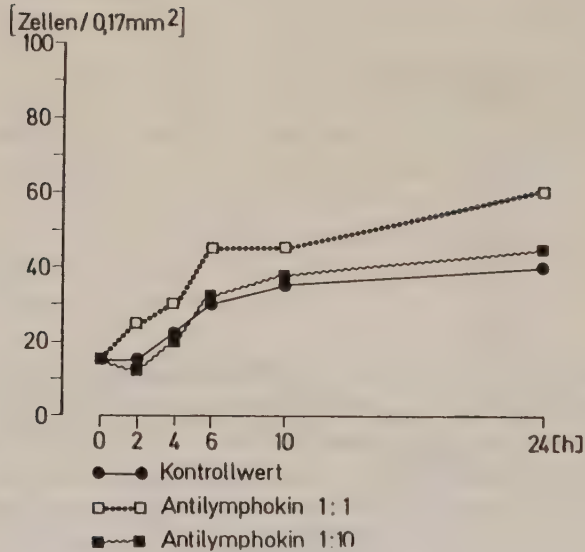


Abb. 21: Die Infiltratzellendichte ($Z/GF (0,17 \text{ mm}^2)$) der Makrophagen bei intrakutaner Applikation von 0,1 ml Antilymphokinserum und 1:10 verdünntem Antilymphokinserum verglichen mit den Kontrollwerten (unbehandelte Gewebeproben). Zeit in Stunden (h) nach Einleitung der Dermatitis mit 1%iger DNCB-Salbe.

Auslösung durch 0,5%iger DNCB-Lösung

Nach Applikation von 0,1 ml 1:10 verdünntem Antilymphokinserum verhielt sich die Mastzellendichte wie bei den Kontrolltieren. Während bei den unbehandelten Tieren erst nach der achten Stunde eine Mastzelleneinwanderung erfolgte, war unter 0,1 ml Antilymphokinserum bereits zwischen der vierten und achten Stunde ein Anstieg der Mastzellen zu erkennen. In der 24. Stunde entspricht die Anzahl der Mastzellen bei Verwendung von Antilymphokinserum mit 35 Z/GF ungefähr dem

Kontrollwert mit 37 Z/GF (Abb. 22).

Bei Verwendung von 0,1 ml 1:10 verdünntem Antilymphokinserum entsprach die Zelldichte der Makrophagen im Versuchszeitraum in großen Zügen den Kontrollwerten. Unter 0,1 ml unverdünntem Antilymphokinserum konnte eine höhere Einwanderung an Makrophagen beobachtet werden. Zu jedem Meßzeitpunkt lagen die Kontrollwerte unter den mit Antilymphokinserum behandelten Tieren. (Abb. 23).

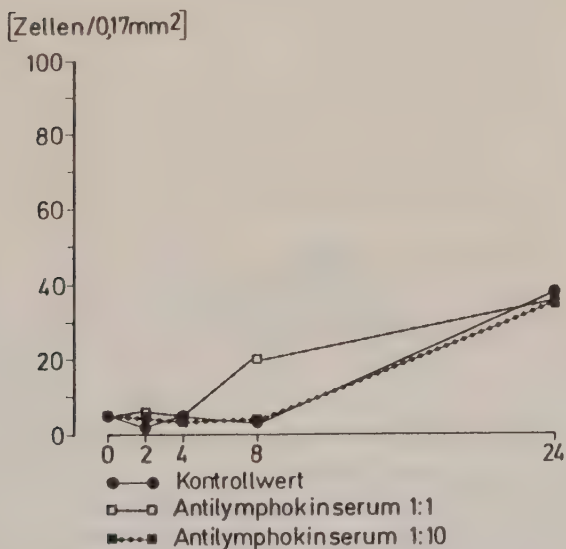


Abb. 22: Einfluß von 0,1 ml unverdünntem Antilymphokinserum und 0,1 ml 1:10 verdünntem Antilymphokinserum auf die Einwanderung von Makrophagen (Zellen/Gesichtsfeld (0,17 mm²) Z/GF) während einer DNCB (0,5%) -induzierten Kontaktdermatitis. Zum Vergleich sind die Kontrollwerte (unbehandelte Hautareale) eingezeichnet. Zeit in Stunden (h) nach Einleitung der Dermatitis.

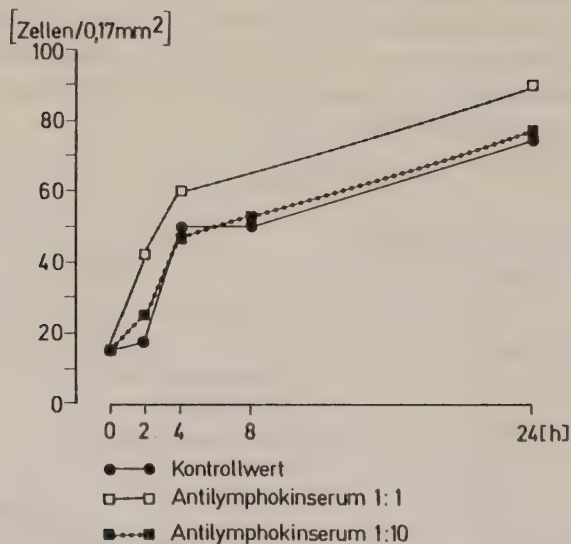


Abb. 23: Vergleich der Auswirkungen von 0,1 ml Antilymphokinserum unverdünnt und 0,1 ml 1:10 verdünntem Antilymphokinserum auf die Kinetik der Makrophagen im Verlauf einer DNCB (0,5%) induzierten Kontaktdermatitis verglichen mit unbehandelten Hautbezirken (Kontrollwerte). Aufgetragen wurden die Anzahl der Zellen pro Gesichtsfeld ($0,17 \text{ mm}^2$) Z/GF) in Abhängigkeit von der Zeit (h).

D. DISKUSSION

1. Diskussion der Methodik

Aufgrund der mannigfachen Präparate und der Anwendung von verschiedenen Substanzen (Antihistaminika, Antilymphokinserum und Antilymphozytenglobuline) waren die Anzahl der gleichbehandelten Tiere relativ gering (25 Meerschweinchen). Außerdem wurden die Tiere zu verschiedenen Meßzeitpunkten (2, 4, 6, 8, 12 und 24 h) getötet, wodurch sich die Zahl pro Zeiteinheit weiter verringerte. Somit lassen sich wegen der geringen Anzahl der Versuchstiere keine statistisch signifikanten Aussagen treffen. Vielmehr hat die Untersuchung den Wert von Vorversuchen, um eventuelle Trends abzulesen. I. MAYR und J. SCHMID konnten in ihren Dissertationsschriften (59, 89) auf unseren Ergebnisse aufbauen.

Das von uns verwendete Antilymphokinserum wurde uns dankenswerter Weise von Herrn Professor de Weck (Bern) zur Verfügung gestellt. Über die Haltbarkeit des Serums bestehen allerdings keine genauen Angaben. Es besteht die Möglichkeit, daß trotz Lagerung bei -70°C es zu einer eingeschränkten Wirksamkeit des Antilymphokinserums gekommen ist.

Bei der enzymzytochemischen Untersuchungsmethode reagieren nach BURG et al. (22) sowohl Basophile als auch Mastzellen NASDCAE-positiv. Eine genaue Differenzierung ist mit der NASDCAE-Reaktion nicht möglich. Ein Ansteigen der Aktivität von NASDCAE kann auf eine Vermehrung von Basophilen und Mastzellen zurückzuführen sein. In unserer Arbeit bezeichnen wir alle NASDCAE-positive Zellen als Mastzellen.

2. Pathomechanismus der allergischen Kontaktdermatitis

Nach den gegenwärtigen Erkenntnissen laufen folgende Mechanismen bei der Entwicklung von allergischen Hautreaktionen von Kontakttypus ab:

In der Vorbereitungsphase tritt die Noxe (Substanz mit niedrigem Molekulargewicht, sogenanntes Hapten) in die Epidermis ein. Immunogene Eigenschaften entwickelt sie nur nach Konjugation mit Proteinträgerstoffen (51). Antigenpräsentierende Langerhanszellen (95) bauen das Hapten-Protein-Konjugat zu einem antigenen Komplex auf und präsentieren diesen den spezifischen Lymphozyten. Bei der Kontaktüberempfindlichkeit scheint die stimulierende Funktion der Makrophagen (97) von den Langerhanschen Zellen, die in der Epidermis eine lückenlose Schicht bilden übernommen zu werden (44, 92).

Regelmäßig in der Epidermis durchstreifende Lymphozyten können das präsentierte Allergen mittels eines Rezeptors erkennen und wandern auf den Lymphwegen in die angrenzenden Lymphknoten (31, 56). Aktivierte T-Lymphozyten proliferieren im regionalen Lymphknoten und teilen sich in Effektor- und Gedächtniszellen auf (99). Die ersteren reagieren auf eine wiederholte Applikation von Hapten mit Freisetzung von Mediatoren, welche die entzündliche Hautreaktion hervorrufen. Die letzteren produzieren weitere Effektorzellen und verstärken den Grad der Sensibilisierung (booster effect) (30, 71, 72).

Vorbereitungs- und Erkennungsphase werden unter dem Begriff der Sensibilisierung (Induktionsphase) zusammengefaßt.

Der Kontakt der Haut mit einem Fremdstoff führt aber keineswegs notwendigerweise zu einer Sensibilisierung. Die aktivierten T-Lymphozyten unterliegen der Negativkontrolle der sogenannten T-Suppressorlymphozyten (45, 70, 76). Diese werden ebenfalls durch die Haptenapplikation aktiviert. Eine andere Möglichkeit der Negativkontrolle der aktivierten Effektorzellen besteht durch die Idiotyp-Antiidiotypregulation. Man versteht darunter eine Antikörperreaktion mit dem

Rezeptor des T-Lymphozyten, die die Funktion des T-Lymphozyten blockieren kann (48).

Die Eliminierung der Suppressorzellen bewirkt eine Verstärkung des Grades der Kontaktüberempfindlichkeit. Es kann dann zur sogenannten Auslösungsphase kommen. Nach erneuter Allergenapplikation reagieren die nun zahlreich vorhandenen aktivierten T-Lymphozyten in der Epidermis mit dem entsprechenden Kontaktallergen, und sezernieren eine Reihe von Faktoren (Zytokine), die die Entzündungsreaktion in Gang setzen.

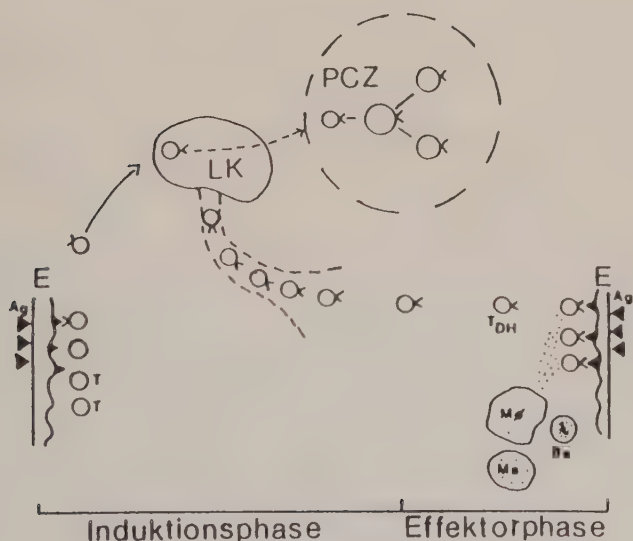


Abb. 24: Ablauf der kontaktallergischen Reaktion nach Knop (48), Immunologische Grundlagen des allergischen Kontaktekzems, S. 17.

E = Epidermis; Ag = Allergen; LK = Lymphknoten

PCZ = paracortikale Zone; T = T-Lymphozyt;

T_{DM} = T-Effektorlymphozyt der Reaktion vom verzögerten Typ;

Mφ = Makrophage; Ma = Mastzellen; Ba = basophiler Lymphozyt

3. Verhalten der Mastzellen und Makrophagen in der Frühphase der allergischen und toxischen Kontaktdermatitis

Nach BRAUN-FALCO und BURG (14, 20) kommt es im Verlauf der allergischen Kontaktdermatitis zu einem Anstieg der Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten. Dabei steht die Reaktion der Peroxydase-negativen Makrophagen am Anfang, anschließend kommt es zu einer mastozytären Reaktion, und am Höhepunkt der Kontaktdermatitis machen die Lymphozyten den Hauptanteil der entzündlichen Reaktion aus (16, 27, 30, 48, 55, 63, 98). In unserer Studie wurde der Anstieg der Mastzellen und Makrophagen in der Frühphase untersucht.

Übereinstimmend mit der Arbeit von KERL, BURG und BRAUN-FALCO (46) zeigt sich in den ersten 24 Stunden ein kontinuierlicher Anstieg der Makrophagen, der der Einwanderung von Mastzellen vor vorausgeht. Der Anstieg der Mastzellen beginnt nach ca. acht Stunden, bei KERL et al. nach zwölf Stunden (Abb. 25). Die zeitliche Differenz kann unter Umständen auf die Problematik der Zellzählung im mikroskopisch erfaßten Gewebeschnitt zurückzuführen sein. In den enzymzytochemisch präparierten Gewebeproben spielt die mikroskopische Feldeinstellung eine entscheidende Rolle. So waren perivaskulär stets wesentlich mehr Mastzellen auszumachen als in nicht vaskularisierten Bereichen (47).

Für die klinische, histologische Unterscheidung einer toxischen von einer allergischen Dermatitis formulierte MIESCHER (62) nach eingehenden morphologisch-klinischen Untersuchungen folgende Kriterien: Gleichförmige mit Nekrosen einhergehende Veränderungen mit scharfen Grenzen sprechen klinisch für eine toxische Reaktion. Histologisch zeigen sich umschriebene Achromien mit Kernpyknosen und dichte Infiltrate aus polynukleären Leukozyten (Granulozyten). Knötchen- und Bläschencharakter bei fehlender Nekrosen mit ungleichmäßiger Verteilung auf die Testfläche und unscharfen Grenzen sind typisch für allergische Reaktionen. Histologisch findet man Spongiose mit Bläschenbildung und

ein Infiltrat aus Lymphozyten (7).

Mit unseren Untersuchungstechniken konnten wir ein unterschiedliches Verhalten in der Kinetik der Mastzellen und Makrophagen beobachten. Bei der toxischen Dermatitis stellten wir durchweg einen geringeren Anstieg der Mastzellen und Makrophagen 24 Stunden nach Auslösung der Entzündungsreaktion fest. Möglicherweise ist dies auf sehr frühzeitig eintretende Schäden an Zellen und Gewebe zurückzuführen (61, 96). Bei der allergischen Reaktion kommt es nach Erkennung des Allergens durch Memory-Zellen zu einer Proliferation allergenspezifischer T-Lymphozyten, die ihrerseits Zytokine ausschütten und dadurch andere Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen anlocken. Während in funktioneller Sicht Exposition und Testung in der Regel eine klare Trennung zwischen toxischem und allergischem Geschehen erlauben bzw. toxisches Geschehen ausschließen, sofern die auslösende Nekrose bekannt ist, stößt die Abgrenzung morphologischer Kriterien auf große Schwierigkeiten, vor allem dann, wenn die Beurteilung auf einem einzigen Ausschnitt im zeitlichen Ablauf einer Reaktion bzw. Krankheitsvorganges angewiesen ist. Je nach Art und Konzentration der Noxe sind die Grenzen zwischen dem allergischen und toxischen Reaktionsbild häufig fließend (62), so daß der Mastzellen- und Makrophagenanstieg zusätzlich eine Hilfe zur Unterscheidung einer toxischen Dermatitis sein kann. Dabei ist zu berücksichtigen, daß der genaue Pathomechanismus der entzündlichen Reaktion einer allergischen Kontaktdermatitis sich immer noch im Stadium der Grundlagenforschung befindet und von einer Abklärung noch weit entfernt ist (41, 60).

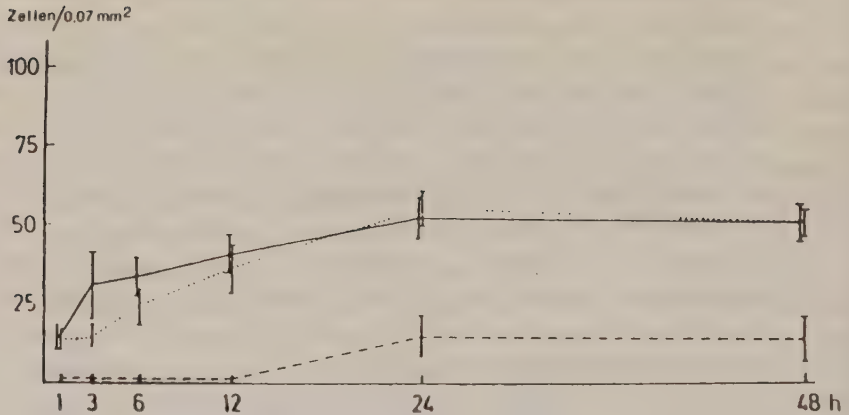


Abb. 25: ——— Makrophagen, ----- Mastzellen,
 Lymphozyten

Allergische DNCB-induzierte Kontaktdermatitis des Meerschweinchen. Anzahl der Zellen im Gesichtsfeld ($0,07 \text{ mm}^2$). Zeit in Stunden (h) nach Applikation von 0,05% DNCB in Aceton (aus Kerl, Burg, Braun-Falco: Arch. Derm. Forsch. 249, S. 221)

4. Die Rolle des Komplementsystems bei der allergischen und toxischen Kontaktdermatitis

Die immunfluoreszenztechnischen Untersuchungen wurden im wesentlichen durchgeführt, um die Rolle von komplementabhängigen Reaktionen bei der allergischen und toxischen

Dermatitis zu studieren.

In der Arbeit von RING et al. (85) über die atopische Dermatitis konnten bei fünf von acht Patienten Immunglobulin- und bei drei Patienten Komplementablagerungen nachgewiesen werden. Während bei der atopischen Dermatitis die zelluläre Immunität erniedrigt ist (60, 81), liegt beim allergischen Kontaktekzem eine gesteigerte immunologische Bereitschaft vor (48). Nach COOMBS und GELL (24) fällt die dem Kontaktekzem zugrundeliegende Reaktion unter Typ IV (Reaktion vom verzögerten Typ), humorale Antikörper sind hier nicht zu erwarten.

In den von uns mittels der Immunofluoreszenztechnik präparierten Gefrierschnitten konnten keine Komplementablagerungen nachgewiesen werden. Unserer Meinung nach ist dieser Befund ein weiterer Beweis dafür, daß das Komplementsystem bei der Entstehung einer allergischen Kontaktdermatitis keine oder eine untergeordnete Rolle spielt.

5. Die Rolle der Lymphozyten bei der allergischen Kontaktdermatitis

Der Begriff Lymphokine wurde durch DUMONDE et al. 1968 (26) geprägt, um all die biologisch aktiven Mediatoren zu erfassen, die nach Lymphozytenstimulation aktiviert werden, aber keine Antikörper sind.

Es handelt sich dabei um eine Vielzahl von löslichen Faktoren, meist Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 15.000 - 60.000 Dalton (34), die durch Lymphozyten produziert werden. Diese Faktoren schließen vermutlich auch biologisch hochaktive Moleküle wie DNA- und RNA-Fragmente, Membranproteine, Interferone, Prostaglandine und cyclische Nucleotiden ein (102, 103).

Als Lymphokine eindeutig erkannt und zugeordnet sind bis heute mitogene Faktoren (MF) (35), ein Faktor, der die

Bewegung von Makrophagen (Macrophage migration inhibitory factor MIF) (5, 25, 34, 104, 106, 111) hemmt und chemisch unterscheidbar davon ein Lymphokin, das die Bewegung von Leukozyten verlangsamt (LIF) (9, 10, 11, 23, 110), ein Faktor, der die Bewegung von Makrophagen erhöht (MAF) (12), chemotaktische Faktoren (CF) (77, 100), die spezifisch mononukleäre Zellen, eosinophile und basophile Leukozyten anlocken, Lymphotoxine (LT) (27, 37) und sogenanntes Typ II Interferon (12). MIF-ähnliche und in einigen Fällen auch LIF- und CF-ähnliche Aktivitäten wurden in Extrakten von Hautreaktion vom verzögerten Typ gefunden (111).

Die Bedeutung der gelegentlich einander antagonisierenden Wirkungen der Lymphokine ist bis heute noch nicht ausreichend geklärt (67, 72, 105, 106, 107, 108). GECZY, OTZ und DE WECK konnten Antikörper herstellen, die gegen MIF, LT und MF gerichtet sind (34).

De WECK et al. (109) brachte Lymphknotenzellen eines Meerschweinchenstammes in die Haut eines Empfängerstammes ein. Intradermale Injektion des Anti-Lymphokin-Globulins um die Transplantatzellen verursachte zusammen mit einer Unterdrückung der Dermatitisreaktion eine Verminderung der mononukleären Zellen und eine Reduktion des epidermalen Verletzungsgrades. Die Unterdrückung der entzündlichen Induration war abhängig von der Konzentration des applizierten Anti-Lymphokin-Globulins.

Herr GRIMM konnte in seiner Dissertationsarbeit (39) zeigen, das das Antilymphokinserum dosisabhängig die Einwanderung der Infiltratzellen ins Korium hemmt, nicht aber die Degeneration der Epidermis verhindern konnte.

Mit Hilfe unserer Untersuchungstechniken konnten wir nach intradermaler Injektion des Antilymphokinserums keinen Unterschied in der Zellkinetik im Vergleich zu der Kontrollgruppe feststellen. Die von GECZY, DE WECK et al. (33) gemachten Beobachtungen mittels intradermal appliziertem Antilymphokinserum eine Kontaktdermatitis zu supprimieren, konnten also von uns nicht nachvollzogen werden. Ursache hierfür könnten die von uns zu gering kon-

zentrierten Antilymphokinseren sein. Wir verwendeten maximal ein Viertel der von GEZCY applizierten Menge. Ebenso könnte die sechsmonatige Lagerungszeit zu einer Abschwächung der Wirkung der Antikörper geführt haben.

6. Die Wirkung von Antilymphozytenglobulin auf die allergische und toxische Kontaktdermatitis

Die aus Antilymphozytenserum gewonnene Immunglobuline G werden als Antilymphozytenglobuline bezeichnet. Durch eine spezifische Beeinflussung und Ausschaltung immunkompetenter Lymphozyten bewirkt es einen suppressiven Effekt auf überwiegend zellulär vermittelte Immunreaktionen ohne gleichzeitige oder gleich intensive Unterdrückung der humoralen Reaktion (50, 104). Antilymphozytenglobulin stellte vor der Entdeckung des Cyclosporin A ein bedeutendes Medikament zur Unterdrückung der Transplantatabstoßung (15, 16, 17, 18, 52) und wird auch heute noch bei Autoimmunerkrankungen eingesetzt (15, 16, 18, 66). Nebenwirkungen können fast alle auf immunologische Reaktionen des Empfängers gegen das Fremdprotein nach vorausgegangener Sensibilisierung zurückgeführt werden (84). GEZCY et al. (33) behandelten an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit DNCB sensibilisierte Meerschweinchen mittels Antilymphozytenglobulin intravenös. Dabei konnten sie eine Entleerung der paracortikalen Regionen der peripheren Lymphknoten feststellen. BACH (4) sowie TURK (101) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Dagegen verhindert intradermal appliziertes Antilymphozytenglobulin nicht die allergische Kontaktdermatitis. LAMELIN und VASSALLI (49) untersuchten histologische Präparate von intradermal injiziertem Antilymphozytenglobulin und zeigten, daß Antilymphozytenglobulin vielmehr selber eine Kontaktdermatitis mit Einwanderung von mononuklearen Zellen in die Dermis hervorruft.

Nach intradermaler Applikation von Antilymphozytenglobulin konnten wir keine Veränderung der Mastzellen- und Makroph-

genimmigration sehen. Dies bestätigt im wesentlichen die Beobachtungen von GECZY et al. (33).

Die suppressive Wirkung von Antilymphozytenglobulin scheint vielmehr zentral als peripher zu wirken (94, 101).

7. Der Einfluß von Histamin-Antagonisten auf die allergische Kontaktdermatitis

Mastzellen und Basophile stellen die zentralen Effektorzellen bei den allergischen Sofortreaktionen dar. Aber auch bei der allergischen Reaktion vom Spättyp kommt es über die Degranulation von Mastzellen und basophilen Leukozyten zu einer Histaminfreisetzung als lokale Gewebsreaktion. Diese Beobachtung machten bei der Maus GERSHORN et al. (36) und beim Menschen DVORAK (28). Als vasoaktive Substanz führt Histamin zu einer Änderung der vaskulären Permeabilität (72, 75) im Entzündungsgebiet. Außerdem lassen in-vitro-Versuche vermuten, daß das freigesetzte Histamin eine immuninhibitorische Wirkung durch Aktion an den H_2 -Rezeptoren der T-Lymphozyten entfaltet (69, 86). Neben den Parietalzellen des Magens konnten auch auf T-Lymphozyten, Mastzellen und basophilen Leukozyten H_2 -Rezeptoren entdeckt werden (65). ROCKLIN (86) konnte zeigen, daß Histamin verschiedene Reaktionen abblocken konnte, unter anderem auch die Typ IV-Reaktion.

Interessanterweise schalteten H_2 -Rezeptorenblocker diese protektive Wirkung des Histamins aus, während dagegen H_1 -Rezeptorenblocker keinen Einfluß nahmen.

Bei der Kontaktdermatitis wird dem Histamin somit eine eher suppressive als eine induktive Rolle zugeschrieben (38, 86). Der suppressive Histamineffekt bei einer Typ IV-Reaktion wurde auch von AVELLA et al. (3) bestätigt. Bei Patienten mit Ulcus duodeni, die sechs Wochen lang mit Cimetidin behandelt wurden, war ein vergrößertes Erythem und eine vermehrte Induration nach Epikutantestung im Vergleich zur

unbehandelten Kontrollgruppe zu beobachten.

Durch die Histaminausschüttung werden die H_2 -Rezeptoren besetzt und damit eine weitere Freisetzung von Histamin verhindert. Bei Anwendung von H_2 -Rezeptorenblockern wird dieser negative Feedback-Mechanismus gehemmt. Es kommt zur vermehrten Histaminausschüttung. Die Entwicklung der Kontaktdermatitis beim Meerschweinchen nicht unterdrücken konnte POLLAK (72, 75) durch H_2 -Antagonisten. Auch unsere Ergebnisse bestätigen die Aussage POLLAKS. Die Gabe des H_2 -Rezeptorenblockers Cimetidin hatte keinen hemmenden Einfluß auf die Einwanderungsfrequenz der Entzündungszellen, in unserem Fall die der Mastzellen und Makrophagen. Eher war ein verstärkender Effekt zu beobachten. Diesen Trend konnte Herr MAYR (59) in seiner Dissertationsarbeit bestätigen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

An 25 sensibilisierten Meerschweinchen wurde die Frühphase der DNCB-induzierten allergischen und toxischen Kontaktdermatitis histologisch, immunfluoreszenztechnisch und histochemisch untersucht. Gemessen wurden enzymzytochemisch die Kinetik der Makrophagen (saure Phosphatase) und Mastzellen bzw. Basophilen (Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase). Der Einfluß von Medikamenten (Histaminantagonisten, Antilymphokinserum und Antilymphozytenglobulin) wurde durch örtliche Vorbehandlung (intrakutane Injektion) geprüft.

In der direkten Immunfluoreszenz waren keine C_3 -Ablagerungen nachweisbar.

Beim Vergleich der Ergebnisse kam es zu einer starken Vermehrung der Makrophagen und Mastzellen bei der allergischen Kontaktdermatitis, während bei toxischer Kontaktdermatitis die Infiltration weniger ausgeprägt war.

H_1 - und H_2 -Rezeptorenblocker wirkten nicht hemmend auf die Einwanderung von Makrophagen und Mastzellen. Durch H_2 -Antagonisten war eher ein Trend zur Reaktionsverstärkung zu beobachten.

Weder Antilymphokinserum noch Antilymphozytenglobulin vermochten die Infiltration von Makrophagen und Mastzellen in unserer Versuchsanordnung zu beeinflussen.

Literatur

- 1) Andrew W., Andrew N.V.:
Lymphocytes in the normal epidermis of the rat and of man.
Anat. Rec. 104, 217 (1949)

- 2) Askenase P.:
Role of basophils, mast cells and vasoamines in hypersensitivity reactions with delayed time course.
Progr. Allerg. 23, 199-320 (1977)

- 3) Avella J., Binder H., Madsen J.E., Askenase P.W.:
Effect of histamine H₂-receptor antagonists on delayed hypersensitivity.
The Lancet, March 25, 624-626 (1978)

- 4) Bach J.F.:
The mode of action of immunosuppressive agents.
Hrsg.: Neuberger A., Tatum C.L. North-Holland, Publishing Company, Amsterdam, S: 227 (1975)

- 5) Baer R., Vogt K., Lazary S., Geczy C., Weck A.L. de:
Lymphokines VI
Factors in human and other heterologous sera inhibiting the migration of guinea pig macrophages.
Z. Immunforsch. Immunbiol. 155, 130-143 (1978)

- 6) Bandmann H.-J., Dohn W.:
Die Epicutantestung S. 128-129
München; J.F. Bergmann (1967)

- 7) Bandmann H.-J.:
Das histologische Bild der kontaktallergischen und alkalitoxischen Ekzeme.
Therapie Umsch. 27, 433-495 (1970)
- 8) Bendtzen K.:
Biological properties of lymphokines.
Allerg. 33, 105-119 (1978)
- 9) Bendtzen K.:
Human leucocyte migration inhibitory factor (LIF)
I. Effect of synthetic and naturally occurring esterase and protease inhibitors.
Scand. J. Immunol. 6, 125-131 (1977)
- 10) Bendtzen K.:
Human leucocyte migration inhibitory factor (LIF)
II. Partial biochemical characterization of the substrate specificities for this lymphokine.
Scand. J. Immunol. 6, 133-140 (1977)
- 11) Bendtzen K.:
Human leucocyte migration inhibitory factor (LIF)
III. Further investigations of this lymphokine and its preference for arginine amides.
Scand. J. Immunol. 6, 1055-1062 (1977)
- 12) Bendtzen K.:
Some physicochemical properties of human leucocyte migration inhibitory factor (LIF)
Acta pathol. microbiol. Scand. 84, 471-476 (1976)
- 13) Bloom B., Bennett B.:
Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed type hypersensitivity.
Science 153, 80-82 (1966)

- 14) Braun-Falco O., Burg G.:
Histochemische und cytochemische Untersuchungen bei der allergischen DNCB-Kontaktdermatitis des Meerschweinchens.
Arch. klin. exp. Derm. 239, 307-322 (1970)

- 15) Brendel W.:
the clinical use of antilymphocyte globulin
Transplant. Proceed. III, 1 (1971)

- 16) Brendel W.:
Grundlagen des Antilymphozytenglobulins und seine therapeutischen Möglichkeiten.
Arzneimittelforschung 20, 191 (1970)

- 17) Brendel W., Land W.:
Grundlagen der Therapie mit Antilymphozytenserum.
In: Autoimmunerkrankungen, Klinik und Therapie.
Brendel W., Hopf U.: Schattauer, Stuttgart (1969)

- 18) Brendel W., Seifert J., Ring J.:
Die klinische Anwendung von Antilymphozytenglobulin.
Münch. Med. Wochenschr. 117, 1361-1368 (1975)

- 19) Bühler E.:
Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig.
Arch. Dermatol. 91, 171-177 (1965)

- 20) Burg G., Braun-Falco O.:
Fortschritte in der cytochemischen Differenzierung von Infiltratzellen der Haut.
Der Hautarzt 25, 1-8 (1974)

- 21) Burg G., Braun-Falco O.:
1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (DNCB)-Salbe zur Sensibilisierung, Testung und Behandlung von Patienten mit malignen Melanomen.
Dtsch. Med. Wochenschr. 102, 210-211 (1977)

- 22) Burg G., Kerl H., Braun-Falco O., Schmoeckel C., Wolff H., Kresbach H.:
Morphological and functional typing of lymphoma cutis.
Int. Dermatopath. Sympos. Munich, Germany June 16-18, 1978

- 23) Chess L., Rocklin R., Maedermott P., David J., Schlossmann S.:
Leucocyte inhibitory factors (LIF): Production by purified human T- and B-lymphocytes.
J. Immunol. 115, 315-317 (1975)

- 24) Coombs R.R.A., Gell P.G.H.:
In: Clinical aspects of immunology.
Hrsg. v. P.G.H. Gell, R.R.A. Coombs, S. 317, Davis Philadelphia 1963

- 25) David J.:
Delayed hypersensitivity in vitro: Its medication by cell free substances formed by lymphoid cell antigen interaction.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 56, 72-77 (1966)

- 26) Dumonde D., Wolstencroft R., Pameyi G., Matthew M., Morley J., Howson W.:
Lymphokines: Non antilively mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation.
Nature 224, 38-42 (1968)

- 27) Dvorak H., Dvorak A., Mihm M.:
Morphologic studies in cellular hypersensitivity in guinea pigs and man.
Monogr. Allergy 8, 54-65 (1974)
- 28) Dvorak A. Mihm M., Dvorak H.:
Degranulation of basophilic leucocytes in allergic contact dermatitis reactions in man.
J. Immunol. 116, 687-695 (1976)
- 29) Eisen H., Tabachnick M.:
Elicitation of allergic contact dermatitis in the guinea pig. The distribution of bound dinitrobenzene groups within the skin and quantitative determinations of the extent of combination of 2,4-dinitrochlorbenzene with epidural protein in vivo.
J. Exp. Med. 108, 773-796 (1958)
- 30) Frey J.R., Polak L.:
Das allergische Kontaktekzem. Immunologische Grundlagen.
Ther. Umschau 27, 479 (1970)
- 31) Frey J.R., Wenk P.:
Experimentelle Untersuchungen zur Pathogenese des Kontaktekzems.
Dermatologica (Basel) 112, 265-305 (1956)
- 32) Geczy A., Baumgartner A.:
Distribution of a contact sensitizer, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, in the tissues of the guinea pig.
Immunology 22, 381-392 (1972)

- 33) Geczy C., Geczy A., Weck A.L. de:
Antibodies to guinea pig lymphokines.
II. Suppression of delayed hypersensitivity reactions
by a second "generation" goat antibody against guinea
pig lymphokines.
J. Immunol. 117, 66-72 (1976)
- 34) Geczy C., Ots U., Weck A.L. de:
Production and characterization of antisera against
human macrophage migration inhibitory factor (MIF).
Mol. Immunol. 17, 539-553 (1980)
- 35) Geha R., Merler E.:
Human lymphocyte mitogenic factor: Synthesis by
sensitized Thymus-derived lymphocytes, dependence of
expression on the presence of antigen.
Cell. Immunol. 10, 86-104 (1974)
- 36) Gershon R., Askenase P. Gershon M.:
Requirement for vasoactive amines for production of
delayed type hypersensitivity skin reaction.
J. Exp. Med. 192, 732-747 (1975)
- 37) Granger G., Williams T.:
Lymphocyte cytotoxicity in vitro: Activation and
release of a cytotoxic factor.
Nature 218, 1253-1254 (1968)
- 38) Greaves M.W.:
H₂-receptor antagonists and delayed hypersensitivity.
The Lancet, I, 880-881 (1978)
- 39) Grimm H.:
Gewebehistaminspiegel und Kinetik der Entzündungs-
reaktion in der Frühphase der Kontaktdermatitis am
Meerschweinchen.
Dissertation, München 1981

- 40) Hentges F., Geczy C., Geczy A., Weck A.L. de:
Antibodies to guinea pig lymphokines.
V. Suppression of normal lymphocyte transfer, immune
lymphocyte transfer and direct reactions in the guinea
pig by antilymphokine-globulin
Immunol. 32, 905-913 (1977)
- 41) Hiserodt J., Granger G.:
Inhibition of human lymphocyte - mediated mitogen-
induced cytotoxicity of murine L-929 cells by heterolo-
gous anti-human lymphotoxin antisera in vitro.
J. Immunol. 119, 374-380 (1977)
- 42) Hunziker N.:
Experimental studies on guinea pig's eczema.
Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1969
- 43) Huber H., Fudenberg H.H.:
Die immunologische Funktion von Monozyten und
Makrophagen.
Klin. Wschr. 20, 1061-1068 (1969)
- 44) Hunziker N., Winkelmann R.K.:
Langerhans Cells in contact dermatitis of the guinea
pig.
Arch. Dermatol. 114, 1309-1313 (1978)
- 45) Katz S.J., Parker D., Sommer G., Turk J.L.:
Suppressor cells in normal immunization as a basic
homeostatic phenomenon.
Nature 248, 612 (1974)

- 46) Kerl H., Burg G., Braun-Falco O.:
Quantitative and qualitative dynamics of the epidural and cellular inflammatory reaction in primary toxic and allergic DNCB-contact dermatitis in guinea pig.
Arch. Derm. Forsch. 249, 207-226 (1974)

- 47) Knapp A., Grosser V., Tolksdorf G.:
Experimentelle Untersuchungen zur Zahl der Mastzellen bei der allergischen Spätreaktion in der menschlichen Haut.
Dermatol. Monatsschrift 160, 6-11 (1974)

- 48) Knop J.:
Immunologische Grundlagen des allergischen Kontaktekzems.
In: Fortschr. prakt. Derm. und Vener., O. Braun-Falco, G. Burg (eds.) Springer 1984 in press

- 49) Lamelin J.P., Vassalli P.:
Inhibition of macrophage migrations by a soluble factor from lymphocytes stimulated with PHA or ALS.
Nature 229, 426 (1971)

- 50) Land W., Rudolph R., Brendel W.:
In vitro-Wirkung eines heterologen Antiserums auf Lymphozyten der Ratte: Eine elektronenmikroskopische Studie.
Blut, XVIII, 1-12 (1968)

- 51) Landsteiner K., Jacobs E.:
Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds.
J. exp. Med. 61, 643 (1935)

- 52) Largiader F., Linder E., Senning A., Scheitlin W., Wegmann W., van Rodd J.J.:
Resultate von 50 Nierentransplantationen.
Schweiz. Med. Wochenschr. 18, 100 (1970)
- 53) Lawrence H.:
Transfer factor in cellular immunity.
Harvey. Lut. 68, 239-250 (1974)
- 54) Leder L.D.:
Der Blutmonocyt.
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1967
- 55) Macher E.:
Allergisches Kontaktekzem und Immuntoleranz.
Hautarzt 4, 145-150 (1969)
- 56) Macher E.:
Die Reaktion der regionären Lymphknoten beim tierexperimentellen allergischen Kontaktekzem.
III. Cytologische Untersuchungen.
Hautarzt 13, 174 (1962)
- 57) Macher E., Chase M.:
Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. XII. The influence of excision of allergenic depots on onset of delayed hypersensitivity and tolerance.
J. exp. Med. 129, 81-102 (1968)
- 58) Marghescu S., Wolff H.H.:
Untersuchungsverfahren in Dermatologie und Venerologie.
J.F. Bergmann-Verlag München, S. 103 (1977)
- 59) Mayr T.:
Untersuchungen unter dem Einfluß von zirkadianen Rhythmen und Histamin H₂-Antagonisten auf Auslösung und

Verlauf der allergischen Kontaktdermatitis beim Meerschweinchen.

Dissertation, München 1984

- 60) Mc Geady S.J., Buckley R.H.:
Depression of cell-mediated immunity in atopic eczema.
J. of Allergy and Clin. Immunol. 56, 393 (1975)
- 61) Metz J.:
Elektronenmikroskopische Untersuchungen an allergischen und toxischen Epicutantestreaktionen des Menschen.
Arch. Derm. Forsch. 245, 125-146 (1972)
- 62) Miescher G.:
Abgrenzung des allergischen und toxischen Geschehens in morphologischer und funktioneller Sicht.
Arch. Klin. Exp. Derm. 213, 297-313 (1961)
- 63) Miescher G.:
Ekzem. Histopathologie, Morphologie, Nosologie.
In: Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten, Band II/1, O. Gans, G. Steigleder (eds.), S. 1-112, Springer Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962)
- 64) Nakagawa S., Fukushima S., Gotoh M., Kohda M., Namba M., Tanioku K.:
Studies on the retest reaction in contact sensitivity to DNCB.
Dermatologica 157, 13-20 (1978)
- 65) Padawer J.:
Mast cell structure: Implications for normal physiology and degranulation.
In: The mast cell, J. Pepys, A. Edwards (eds.), pp. 1-8, Pitman Medical Publishing Co. Ltd., Kent, England 1979

- 66) Pichlmayr R.:
Die Bedeutung von Antilymphozytenserum für die Immunsuppression.
Schweiz. Med. Wochenschr. 97, 1624 (1967)
- 67) Pick E.:
Lymphokines. Physiologic control and pharmacological modulation of their production and action.
In: Comprehensive Immunology, 3, Immunopharmacology, R. Good, S. Day (eds.), pp. 163-202, Plenum Medical Book Co., New-York-London 1977
- 68) Pirquet C. von:
Allergie.
Münch. med. Wochenschr. 30, 1457-1458 (1906)
- 69) Plant M., Lichtenstein L.M., Gillespie E., Henny C.S.:
J. Immunol. 111, 389 (1973)
- 70) Polak L., Rinck C.:
Effect of elimination of suppressor cells on the development of DNCB contact sensitivity in guinea pigs.
Immunology 33, 305-311 (1977)
- 71) Polak L.:
Gegenwärtiger Wissensstand auf dem Gebiet der allergischen Hautreaktionen.
Ärztl. Kosmetologie 13, 25-36 (1983)
- 72) Polak L.:
Immunological aspects of contact sensitivity. An experimental study.
Monographs in Allergy, Vol. 15, Basel, S. Karger 1980

- 73) Polak L.:
Recent trends in the immunology of contact sensitivity.
I.
Contact Dermatitis 4, 249-255 (1978)
- 74) Polak L.:
Recent trends in the immunology of contact sensitivity.
II.
Contact Dermatitis 4, 256-263 (1978)
- 75) Polak L.:
Vasoactive mediators in contact sensitivity.
In: New trends in allergy, J. Ring, G. Burg (eds.), pp.
187-199, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York
1981
- 76) Polak L., Rinck C.:
Persistent activity of suppressor cells in T-cell
mediated immune response.
J. Immunol. 121, 162 (1978)
- 77) Ramseier H.:
leucostatic factor elaborated by mixtures of
genetically dissimilar cells.
Science 157, 554-556 (1967)
- 78) Remold H.:
Requirement for alpha-L-fucose on the macrophage
membrane receptor for MIF.
J. Exp. Med. 138, 1065-1076 (1973)
- 79) Ring J.:
Anaphylaktoide Reaktionen.
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1978

- 80) Ring J.:
Angewandte Allergologie.
MMW-Medizin-Verl.-München 1983
- 81) Ring J.:
Atopic dermatitis: A disease of general vasoactive
mediatordysregulation.
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 59, 233-239 (1979)
- 82) Ring J.:
Mechanismen der akuten allergischen Reaktion.
Münch. Med. Wschr. 123, 1670- 1674 (1981)
- 83) Ring J., Seifert J., Lob G., Coulin K., Brendel W.:
Humanalbuminverträglichkeit: Klinische und immunologi-
sche Untersuchungen.
Klin. Wochenschr. 52, 595-598 (1974)
- 84) Ring J., Seifert J., Lob G., Land W., Coulin K.,
Brendel W.:
Zum Risiko einer ALG-Therapie. Mögliche Nebenwirkungen,
Prophylaxe und Behandlung.
Klin. Wochenschr. 51, 487-493 (1973)
- 85) Ring J., Senter T., Cornell R.C., Arroyave C.M., Tan
E.M.:
Complement and immunoglobulin deposits in the skin of
patients with atopic dermatitis.
Brit. Journ. Dermatol. 99, 495-501 (1978)
- 86) Rocklin R.:
Modulation of cellular-immune responses in vivo and in
vitro by histamine receptor bearing lymphocytes.
J. Clin. Invest. 57, 1051-1058 (1976)

- 87) Rose N.R., Friedmann H.:
Manual of clinical immunology 1976.
Amer. Soc. Microbiol. Wash. D.C. 1976

- 88) Ruddle N., Waksman B.:
Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes
in delayed hypersensitivity. III. Analysis of
mechanism.
J. Exp. Med. 128, 1267-1279 (1968)

- 89) Schmid J.G.:
Experimentelle Untersuchungen zur Aussagekraft
verschiedener makroskopischer Ableseverfahren bei DNCB-
induzierter Kontaktdermatitis beim Meerschweinchen.
Dissertation, München 1982

- 90) Schubert H., Raith L.:
Basophile Granulozyten und allergisches Kontaktekzem.
Dermatol. Monatsschr. 165, 868-870 (1979)

- 91) Seifert J., Land W., Brendel W.:
Electron microscopic and isotopic studies on the
cytotoxic effect of antilymphocyte serum.
Brit. J. Surg. 56, 617 (1969)

- 92) Silberberg J., Baer R.L., Rosenthal S.:
The role of Langerhans cells in allergic contact
hypersensitivity. A review of findings in man and
guinea pigs.
J. Invest. Derm. 66, 210 (1976)

- 93) Skog E., Wahlsberg J.:
Immunological tolerance and dermal eosinophilia induced
in dinitrochlorobenzene sensitized guinea pig.
Acta Derm. venerol. 54, 437-441 (1974)

- 94) Starzl T.E., Groth G.G., Kashiwagi N., Putman C.W.,
Corman J.L., Halgrinsen C.G., Penn J.:
Clinical experience with horse antihuman antilymphocyte
globulin.
Transplant. 4, 4 (1972)
- 95) Stingl G.:
New Aspects of Langerhans Cell function.
Int. J. Derm. 19, 189-213 (1980)
- 96) Storck H.:
Das experimentelle Ekzem.
In: Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten, Band
II/1, O. Gans, G. Steigleder (eds.), S. 114-211,
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-Göttingen 1962
- 97) Thomas D.W., Forni G., Shevach E.M., Green J.:
The role of macrophage as the stimulator cell in
contact sensitivity.
J. immunol. 118, 1677 (1977)
- 98) Turk J.L., Heather C.J., Diengdoh J.V.:
A histochemical analysis of mononuclear cell
infiltrates of the skin with particular reference to
delayed hypersensitivity in the guinea pig.
Int. Arch. Allergy 29, 278-289 (1966)
- 99) Turk J.L., Ort J.:
The production of sensitized cells in cell-mediated
immunity.
In: U. Studer, H. Cottier (eds.), Handbuch der
allegemeinen Pathologie Band 7/3, Teil Immune
reactions, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York,
S. 392 (1970)
- 100) Turk J.L., Rudner E.J., Heather C.J.:
A histochemical analysis of mononuclear cell

infiltrates of the skin.

II. Delayed hypersensitivity in the human.

Int. Arch Allergy 30, 248-256 (1966)

101) Turk J.L., Willonghby D.A.:

Central and peripheral effects of antilymphocyte sera.
Lancet I, 249 (1967)

102) Ueda K., Kambara T.:

The chemical mediation of delayed hypersensitivity skin reactions. II. Characterization of a macrophage chemotactic factor from bovine gamma-globulin-induced skin reactions in guinea pigs.

Am. J. Path. 92, 241-252 (1978)

103) Waksman B.:

Immunoglobulins and lymphokines as mediators of inflammatory cell mobilization and target cell killing.
Cell. Immunol. 27, 309-315 (1976)

104) Weck A.L. de:

Immunsuppression (theoret. Grundlagen).
Verl. Dtsch. Ges. Inn. Med. 78, 750-751 (1972)

105) Weck A.L. de:

Lymphocyte active serum factors.
Dev. Biol. Stand. 27, 91-97 (1974)

106) Weck A.L. de:

Molecular mechanism of T- and B-lymphocyte triggering.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 49, 247-254 (1975)

107) Weck A.L. de:

Molecular models for induction of the immun response and their relationship to the genetic control of histocompatibility antigens.
Transplant. Rev. 10, 3-35 (1972)

- 108) Weck A.L. de:
Summing up: Soluble mediators of immunity.
Adv. Exp. Med. Biol. 114, 533-537 (1979)
- 109) Weck A.L. de, Oetz U., Geczy C., Geczy A.:
Activity and molecular properties of mitogenic factors
produced by mixed lymphocytes reactions (MLC-MF) in
human and guinea pigs.
Transplant. Proc. 11, 1387-1389 (1979)
- 110) Weisbart R., Yu D., Billing R., Fan P., Clements P.,
Paulus R.:
Cellular collaboration in the production of human
leucocyte migration inhibition factor (MCF).
Immunology 34, 815-819 (1978)
- 111) Yoshida T., Bigazzi P., Cohen S.:
The production of anti-guinea-pig lymphokine antibody.
J. Immunol. 114, 688-691 (1975)

G. ANHANG

1. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die einen Beitrag zu meiner Arbeit geleistet haben:

- Prof. Dr. Dr. O. Braun-Falco für die Arbeitsmöglichkeit in der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München
- Prof. Dr. J. Ring für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die freundliche Betreuung und für fruchtbare Anregungen bei dieser Arbeit
- Prof. Dr. G. Burg für die Ratschläge und Kritik bei der Beurteilung der Präparate
- Frau Franziska Beier für die tatkräftige Unterstützung bei Organisation und Durchführung der Versuche
- Frau Ebmayr und Frau Heilman für Ratschläge und für die Beratung bei der Anfertigung der Präparate
- Herrn Dumhard für die Betreuung der Tiere und seine Hilfsbereitschaft bei der Versuchsdurchführung
- Frau Schiffelholz und Frau Fottner-Öelerkring für die Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen
- Meinem Mann für die Durchsicht des Manuskriptes

2. Lebenslauf

Name : Bie-Swan Tan-Nattermann, geb. Tan

Geburtsdatum : 12.09.1953

Geburtsort : Surabaia in Indonesien

Eltern : Tan Hong-Liat, Kaufmann und Ehefrau
Blauw-Nio, geb. Ong

Staatsangehörigkeit : seit 1977 im Besitz der deutschen Staats-
angehörigkeit

Schulbildung : 1958-1960 Volksschule in Surabaia/Indonesien
1960-1962 Volksschule in Singapore
1963 Volksschule in Bad Reichenhall
1963-1964 Karlsgymnasium in Bad Reichenhall
1964-1972 Louise-Schröder-Gymnasium in München
1972 Abitur

Studium : 1972 Physik an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München
1973-1979 Humanmedizin an der Ludwig-
maximilians-Universität in München

Abschluß : 1979 Staatsexamen

Berufstätigkeit: seit 1980 in der Facharztausbildung am
Institut für Anästhesiologie der Ludwig-
Maximilians-Universität in München

Persönliche

Verhältnisse : 1980 Heirat mit Dr. med. Ulrich Nattermann
1983 Geburt des Sohnes Marcel
zur Zeit wohnhaft in 8000 München 50,
Wichertstraße 7

1. Einleitung

2. Hauptteil

3. Schluss

4. Literaturverzeichnis

5. Anhang

6. Zusammenfassung

7. Bibliographie

8. Glossar

9. Index

10. Literaturverzeichnis

11. Anhang

12. Zusammenfassung

13. Bibliographie

14. Glossar

15. Index

16. Literaturverzeichnis

17. Anhang

18. Zusammenfassung

19. Bibliographie

20. Glossar

21. Index

22. Literaturverzeichnis

